



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudio de nuevas aproximaciones terapéuticas para la regeneración neural y el tratamiento de la espina bífida mediante el uso de terapia celular durante la etapa fetal

Alejandra Fernández Martín

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ  
PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

**ESTUDIO DE NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS PARA LA  
REGENERACIÓN NEURAL Y EL TRATAMIENTO DE LA ESPINA BÍFIDA  
MEDIANTE EL USO DE TERAPIA CELULAR DURANTE LA ETAPA FETAL**

Memòria presentada per **Alejandra Fernández Martín** per optar al títol  
de doctor per la universitat de Barcelona

Director/s: Mario Marotta Baleriola, José Luis Peiró Ibáñez

Doctorand/a: Alejandra Fernández Martín

Tutor/a: Pedro Marrero González

Alejandra Fernández Martín, 2017





# Índice de contenidos

Resumen.....	1
Introducción .....	3
1. Defectos en el tubo neural.....	5
1.1. Desarrollo del tubo neural en la embriogénesis .....	7
1.2. La espina bífida.....	8
2. Terapias actuales para el MMC.....	12
2.1. Intervención quirúrgica pre- y post-natal .....	13
2.2. Sellantes y fetoscopia .....	15
3. Bioingeniería celular y tisular .....	16
3.1. Las células madre .....	17
3.1.1. Células madre mesenquimales.....	19
3.1.2. Células Madre Mesenquimales del LA .....	19
3.1.3. Células Madre Neurales (NSCs) .....	21
3.1.4. Células Progenitoras Neurales (NPCs).....	23
3.2. <i>Scaffolds</i> .....	30
3.3. Modelos animales de MMC.....	31
3.3.1. Modelo de MMC en roedores .....	31
3.3.2. Modelo de MMC en aves .....	33
3.3.3. Modelo de MMC en lagomorfos .....	34
3.3.4. Modelo ovino de MMC.....	35
3.3.5. Modelo de MMC en primates no humanos .....	37
Hipótesis de trabajo .....	39
Objetivos .....	43

Materiales y métodos .....	47
1. Obtención de muestras de LA y LCF .....	49
1.1. Muestras de LA.....	49
1.1.1. Origen ovino .....	49
1.1.2. Origen humano .....	49
1.2. Muestras de LCF .....	50
1.2.1. Obtención de muestras de LCF de origen ovino .....	50
1.2.2. Obtención de muestras de LCF de origen humano.....	51
2. Cultivo celular de LA y LCF.....	52
2.1. Establecimiento del control positivo.....	52
2.2. Cultivo primario de LCF .....	53
2.3. Cultivo primario de LA.....	54
2.4. Optimización de las condiciones de cultivo .....	55
2.5. Estudios de proliferación celular.....	58
2.6. Aislamiento de clones .....	58
3. Purificación celular .....	59
4. Ensayos de diferenciación celular .....	61
4.1. Diferenciación arbitraria .....	62
4.2. Diferenciación específica hacia linaje neuronal.....	62
4.3. Diferenciación específica hacia linaje astrocitario .....	63
4.4. Diferenciación específica hacia linaje oligodendrocitario.....	63
5. Inmunocitofluorescencia.....	64
6. Western-blot .....	65
6.1. Preparación de las muestras para Western-blot .....	65
6.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	66
6.3. Transferencia de las proteínas a una membrana.....	67
6.4. Incubación con anticuerpos específicos y revelado de la membrana .....	68

7.	RT-PCR semicuantitativa .....	69
8.	Modelo de MMC en conejo .....	71
8.1.	Generación de MMC quirúrgico en modelo de conejo.....	71
9.	Trasplante celular en MMC modelo de conejo.....	72
9.1.	Trasplante celular en modelo <i>in vivo</i> de MMC en conejo.....	73
10.	Modelo de MMC en oveja.....	74
10.1.	Creación del MMC quirúrgico en feto de oveja .....	74
10.2.	Trasplante celular y cierre quirúrgico del defecto de MMC en modelo fetal ovino .....	75
10.3.	Cesárea y extracción de tejidos en modelo fetal ovino .....	76
11.	Tinciones histológicas.....	77
11.1.	Tinción hematoxilina/eosina .....	77
11.2.	Tinción con reactivo de Nissl.....	78
12.	Localización celular mediante fluorescencia en tejido medular ..	78
	Resultados.....	81
1.	Cultivo de las muestras .....	83
1.1.	Establecimiento del control positivo.....	83
1.2.	Cultivo de LA.....	84
1.2.1.	Muestras de origen ovino.....	84
1.2.2.	Muestras de origen humano .....	85
1.2.3.	Aislamiento de clones en LAs .....	85
1.3.	Cultivo de LCF .....	87
1.3.1.	Muestras de origen ovino.....	87
1.3.2.	Muestras de origen humano .....	88
2.	Análisis de la presencia de NPCs en LAs.....	90
2.1.	LA de origen ovino .....	90
2.2.	LA de origen humano .....	92
3.	Análisis del LCF .....	94

3.1.	LCF de origen fetal de oveja .....	94
3.2.	LCF de origen humano .....	94
4.	Diferenciación celular en cultivo .....	96
4.1.	NPCs presentes en LA .....	96
4.1.1.	Marcadores de diferenciación neural LA humano .....	96
4.1.2.	Purificación de NPCs del LA humano con MMC .....	97
4.1.3.	Diferenciación <i>in vitro</i> de NPCs purificadas .....	98
4.2.	NPCs derivadas de LCF .....	99
4.2.1.	Diferenciación aleatoria de las NPCs <i>in vitro</i> .....	99
4.2.2.	Diferenciación <i>in vitro</i> específica de NPCs .....	101
5.	Modelo de MMC en conejo .....	104
5.1.	Optimización de lesión medular en conejo para imitar la lesión en MMC humano .....	105
5.2.	Optimización del <i>scaffold</i> para las cells NPCs humanas .....	108
5.3.	Trasplante celular en modelo de MMC en conejo .....	108
5.4.	Trasplante celular en modelo de MMC en oveja .....	111
	Discusión .....	115
1.	Malformaciones congénitas y defectos del tubo neural: La Espina bífida .....	117
2.	El Mielomeningocele .....	117
3.	Terapias actuales para el tratamiento del Mielomeningocele .....	118
4.	Terapia celular para la regeneración neural y tratamiento del MMC	119
5.	Células precursoras neurales presentes en el líquido cefalorraquídeo	120
5.1.	Cultivo celular y propiedades neurogénicas de NPCs derivadas de LCF humano .....	123
5.2.	Capacidad de diferenciación neuronal y glial de las NPCs derivadas del LCF .....	124

6. Presencia de células precursoras neurales en líquido amniótico de pacientes con espina bífida .....	126
7. Terapia celular para la regeneración neural en modelos animales de MMC.....	129
7.1. Modelos animales de MMC .....	129
7.1.1. Modelo de MMC en conejas gestantes .....	130
7.1.2. Modelo de MMC en ovejas gestantes.....	132
7.2. Trasplante celular en modelos animales.....	132
7.2.1. Trasplante celular en modelo de lesión neural en lagomorfos. ....	134
7.2.2. Trasplante celular en modelo de lesión neural en ovejas.	135
Conclusiones .....	139
Agradecimientos .....	143
Bibliografía .....	147

# Índice de figuras

Figura 1- Clasificación de los distintos tipos de defectos del tubo neural .	6
Figura 2- Recién nacido afectado de espina bífida. Fuente: Humpath.com .....	8
Figura 3- Proceso de neurulación primaria .....	9
Figura 4- Tipos de espina bífida cística.....	9
Figura 5- Afectación de la médula espinal en función del tipo de NTD. (Patten 1952).....	10
Figura 6-Métodos de diagnóstico de MMC: ecografía (A) y RMN (B).....	11
Figura 7- Imágenes de la reparación de MMC mediante cirugía prenatal abierta. Colocación de la madre (A), exposición de la zona lumbar del feto (B), reparación del MMC. ....	14
Figura 8- Esquema de potenciales estrategias en terapia celular y medicina regenerativa .....	17
Figura 9- Proliferación y diferenciación de las NSCs (Vishwakarma, Bardia et al. 2014) .....	24
Figura 10- Estructura del SVZ y distribución celular(Vishwakarma, Bardia et al. 2014) .....	25
Figura 11- Marcadores específicos de células neurales. Fuente: R&D company.....	28
Figura 12- Modelos de MMC en ratón (Stiefel, Copp et al. 2007; Escobedo, Contreras et al. 2013) .....	32
Figura 13- Modelo de MMC en rata. (Ma, Bao et al. 2012) .....	32
Figura 14- Modelo de MMC en pollo, corte sagital (A) y longitudinal (B). (Pamir, Ali et al. 2006).....	34
Figura 15- Creación de la lesión en feto de conejo (A) Lesión de MMC en feto de conejo nacido (B) .....	35
Figura 16- Cirugía de creación del MMC en oveja. Apertura de las estructuras mediante laminectomía (A) y de la duramadre para exposición de la médula espinal (B).....	36
Figura 17- Modelo de MMC en Macaca Mulatta. Fuente: (Galvan- Montano, Cardenas-Lailson et al. 2007) .....	37
Figura 18- Recogida de LA del útero ovino .....	49

Figura 19- Externalización del útero en una cirugía reparadora de MMC (A) y recogida de LA (B) .....	50
Figura 20- Obtención del LCF en la oveja a partir de la cisterna magna (A) o del canal medular (B) .....	51
Figura 21- MMC cístico de donde se obtiene el LCF humano durante la intervención quirúrgica de reparación del defecto.....	51
Figura 22- Diferentes métodos para el aislamiento de clones.....	59
Figura 23- Esquema de la separación inmunomagnética .....	60
Figura 24- Cultivo de neuroesferas como control positivo para las NPCs a partir de la médula espinal humana (A) y médula espinal de cordero (B) .....	83
Figura 25- Inmunocitofluorescencias de marcadores específicos de NSCs en neuroesferas aisladas a partir de médula espinal humana (A) y médula espinal de cordero (B) .....	83
Figura 26- Cultivo de LA de oveja sana y con lesión de MMC.....	84
Figura 27- Establecimiento del cultivo primario de LA de pacientes sanos y con MMC .....	85
Figura 28- Diferentes clones aislados a partir de un mismo LA de oveja sano (A) como con MMC inducido quirúrgicamente (B).....	86
Figura 29- Clones aislados del LA de individuos sanos (A) y pacientes con MMC congénito (B) .....	86
Figura 30- Métodos de recogida de LCF de oveja, del canal medular una vez realizada la lesión del MMC (A) y de la cisterna magna (B).....	87
Figura 31- Cultivo primario de LCF de oveja (A) y gráfica de crecimiento celular (B) .....	88
Figura 32- MMC cístico en el momento de la cirugía reparadora (A) y recogida del LCF del quiste y establecimiento del cultivo primario.....	89
Figura 33- Cultivo primario de LCF de humano (A) y gráfica de proliferación celular durante 5 días (B).....	90
Figura 34- ICF de marcadores de células progenitoras neurales en el LA de origen ovino (A) y análisis mediante WB de marcadores de pluripotencialidad (B).....	91
Figura 35- Inmunocitofluorescencia de LAs humanos para marcadores neurales específicos (A), porcentajes de células positivas para estos marcadores (B) y análisis de los datos obtenidos para la presencia de los marcadores de progenitores neurales por RT-PCR semicuantitativa (C).	93

Figura 36- Marcadores de progenitores neurales en LCF de feto de oveja en cultivo primario en proliferación .....	94
Figura 37- Inmuncitofluorescencia para marcadores específicos neurales en LCF de origen humano (A), porcentaje de células positivas para los mismos (B), análisis por RT-PCR para esos marcadores respecto al gen control GAPDH (C y D).....	95
Figura 38- ICF de marcadores específicos de diferenciación neural en LA humano en proliferación.....	96
Figura 39- ICF de marcadores de NPCs en células CD15+ y - tras la purificación a partir de LA de pacientes con MMC .....	98
Figura 40- Marcadores específicos de progenitores neurales y de diferenciación neural de las NPCs purificadas de LAs de MMC antes y después de diferenciarlas con medios específicos .....	99
Figura 41- ICF de LCF de oveja con marcadores específicos de los tres linajes neurales cuando se indujeron a la diferenciación mediante la privación de factores de crecimiento.....	100
Figura 42- Morfología de las células del LCF humano al diferenciarse mediante la privación de factores de crecimiento (A) y marcadores específicos analizados mediante ICF en las células de LCF diferenciadas .....	100
Figura 43- Morfología y análisis por ICF de las NPCs derivadas de LCF con marcadores específicos de diferenciación .....	102
Figura 44- Gráficas representativas de la variación en la expresión de marcadores específicos de diferenciación de las NPCs procedentes del LCF. ....	103
Figura 45- Modelo de lesión quirúrgica y química de MMC en conejo .	104
Figura 46-Tinciones Nissl de las médulas de fetos de conejo tratadas en las distintas condiciones.....	106
Figura 47- Tabla de las mediciones de las áreas grises y blancas en función de las condiciones utilizadas (A). Gráfico representativo del daño medular causado en relación a las condiciones utilizadas en cada uno de los casos y en comparación con una médula sana (azul) y una lesión de MMC dejada evolucionar (rojo) .....	107
Figura 48- Células del LCF transducidas con lentivirus de expresión del gen reportero rojo y embebidas en el scaffold.....	109

Figura 49- Modelo de lesión de MMC en el feto de conejo y reparación con <i>scaffold</i> con células de LCF .....	109
Figura 50- Tinción de H&E donde se observa la médula espinal lesionada cubierta por el parche y la piel (A) e imagen de fluorescencia en la que en rojo están las células del LCF humano transfectadas y colocadas en el lugar de la lesión (B) .....	110
Figura 51- Cirugía de creación del MMC en oveja (A) y de reparación del defecto (B) .....	111
Figura 52- Imágenes obtenidas en microscopio de fluorescencia de un feto de oveja con MMC trasplantado con células fluorescentes (rojo) de LCF humano a 40x (A) y 100x (B) .....	112

# Índice de tablas

Tabla 1- Ensayos clínicos que se están llevando a cabo en la actualidad con NSCs.....	26
Tabla 2- Marcadores específicos de células del linaje neural. Fuente:(Vishwakarma, Bardia et al. 2014).....	27
Tabla 3- Relación de productos probados para la establecer las condiciones óptimas de proliferación celular. ....	55
Tabla 4- Relación de <i>primers</i> utilizados para la RT-PCR .....	70
Tabla 5- Condiciones de concentración de detergente y tiempo de utilización para la generación del MMC en conejo.....	72



# Abreviaciones

**AfSCs:** *Amniotic fluid Stem Cells*  
**APS:** Persulfato amónico  
**BDNF:** *Brain- derived neurotrophic factor*  
**BSA:** Albúmina sérica bovina  
**CNS:** Sistema nervioso central  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético  
**EGF:** *Epidermal Growth Factor*  
**FBS:** *Fetal Bovine Serum*  
**FGF2:** *Fibroblastic Growth Factor*  
**HRP:** Peroxidasa de rábano  
**LA:** Líquido amniótico  
**LCF:** Líquido cefalorraquídeo  
**MB:** Materia Blanca  
**MG:** Materia Gris  
**MMC:** Mielomeningocele  
**NGF-  $\beta$ :** Nerve growth factor  
**NPCs:** Neural Progenitor Cells  
**NSCs:** Neural Stem Cells  
**NTD:** Defectos tubo neural  
**PBS:** Phosphate Buffered Saline  
**PFA:** Paraformaldehído  
**PVDF:** Polifluoruro de vinilideno  
**RA:** Ácido retinoico  
**Rfp:** *Red Fluorescent Protein*  
**RIN:** RNA integrity number  
**Rpm:** Revoluciones por minuto  
**SDS:** Dodecil sulfato sódico  
**SNC:** Sistema Nervioso Central  
**SVZ:** Zona subentricular  
**TEMED:** Tetrametiletildiamina  
**w/o:** Sin



# Resumen



El mielomeningocele (MMC), la forma más severa de espina bífida, es una malformación del tubo neural que se presenta en tres de cada diez mil nacimientos, y que provoca un grave daño neurológico y un complejo cuadro clínico en el feto en desarrollo. Aunque sus causas son desconocidas, se está ahondando en el conocimiento de las mismas así como en el desarrollo de nuevas terapias, incluyendo las basadas en medicina regenerativa que se dirigen a la reparación prenatal del defecto, mediante estrategias de regeneración del tejido neural dañado con el fin de revertir el daño causado por el defecto congénito sobre la médula espinal.

En este estudio, se analizaron los líquidos amnióticos (LA) de fetos sanos y afectados con MMC para caracterizar los distintos tipos celulares e identificar y aislar las células con propiedades de precursores neurales; también se analizaron las diferentes poblaciones celulares presentes en el líquido cefalorraquídeo (LCF) procedentes de muestras de pacientes afectados por MMC y se evaluó su capacidad de diferenciación *in vitro* a células de linaje neural con el fin de demostrar sus propiedades como progenitores neurales (NPCs).

Se ha demostrado la presencia de NPCs en el LA de pacientes con MMC que no se observaron en muestras de LA de individuos sanos. Se pudo demostrar que estas células se encuentran presentes en el LCF y que su presencia en el LA de fetos con MMC se debe posiblemente a la pérdida de LCF desde el canal medular hacia la cavidad amniótica a través del defecto de MMC, por lo que pueden ser idóneas para una futura estrategia terapéutica basada en la terapia celular en pacientes con MMC.

Una vez demostrado el potencial de estas células como progenitores neurales, se llevaron a cabo ensayos de trasplante celular en modelos animales. En primer lugar se ensayó la técnica de trasplante celular en un nuevo modelo de MMC quirúrgico en conejo y tras demostrar que estas células permanecen en el lugar del trasplante y que no se vio afectada su viabilidad tras la implantación sobre la zona lesionada de la médula espinal, se extrapoló esta metodología al modelo de MMC en oveja, consiguiendo también resultados positivos, y demostrando la presencia y viabilidad de las células trasplantadas más de dos meses después de la realización del trasplante y sin haberse producido rechazo inmunológico.

Los prometedores resultados obtenidos en el presente trabajo podrían ser la antesala para el desarrollo de una novedosa estrategia basada en terapia

celular para la regeneración del tejido neural de la médula espinal mediante intervención prenatal en fetos con MMC. Esta nueva estrategia terapéutica podría permitir el ensayo de la terapia celular basada en el trasplante autólogo de NPCs aisladas a partir del LA del propio paciente en futuros ensayos clínicos en pacientes con espina bífida.

# **Introducción**



## 1. Defectos en el tubo neural

Los defectos en el tubo neural (NTDs) son anomalías congénitas del sistema nervioso central, es decir, se pueden producir en el cerebro, la médula y la columna vertebral y se basan en un defecto en el cierre de diferentes estructuras óseas. Junto a las cardiopatías y los defectos genito-urinarios, se encuentran entre las malformaciones congénitas más frecuentes con una incidencia de 3-4 casos cada 10000 nacimientos. (Dolk, Loane et al. 2010)

Hay diferentes tipos de NTD, en función de los cuales se establece la gravedad de la enfermedad (Copp and Greene 2013) la explicación de cada uno de ellos es la que continúa y quedan reflejados en la Figura 1:

1. **NTDs abiertos:** Normalmente van acompañados de una pérdida de líquido cefalorraquídeo (LCF), son las lesiones más graves, pueden afectar al cerebro o a la médula espinal:

- a. **Exencefalia:** Se produce un fallo de cierre a nivel craneal, así, los pliegues neurales permanecen abiertos y expuestos. Con el continuo crecimiento y diferenciación el epitelio neural aparece como una protuberancia, dando lugar a la exencefalia. La región queda abierta y la bóveda del cráneo no se forma.

- b. **Anencefalia:** También se produce por un defecto en el cierre a nivel craneal. Se puede dividir en dos tipos en función de cuál sea la principal zona afectada; si corresponde al cerebro caudal y a la bóveda se denomina meroacrania, si afecta a la parte posterior del cerebro y a la subbóveda cerebral se denomina holocrania.

Ni la exencefalopatía ni la anencefalopatía son compatibles con la vida, por lo que los fetos afectados o bien mueren durante la gestación o a las pocas horas de nacer.

- c. **Espina bífida abierta:** El fallo del cierre en los tejidos de la zona lumbar se produce a nivel espinal, a lo largo del cuerpo axial. Normalmente, son compatibles con la vida pero con un elevado nivel de afectación del sistema motor, sensorial o el genitourinario. El primero de los NTD más comunes es el mielomeningocele (MMC) en el cual el tejido neural expuesto queda rodeado de un fino quiste; el segundo defecto más común es el mielocelo, en este caso el tejido neural queda directamente expuesto al líquido amniótico

(Copp, Greene et al. 2003). En el MMC el quiste que se forma alrededor del tejido neural expuesto está lleno de líquido cefalorraquídeo (LCF) y, si las membranas de este quiste se perforan o sufren algún daño durante la gestación, el LCF se libera hacia el líquido amniótico (Meuli and Moehrlen 2014).

2. **NTDs cerrados:** Son menos severos e incluso pueden ser asintomáticos, dado que o bien, no existe exposición del tejido neural o no hay pérdida de LCF. Normalmente, afectan a la médula espinal y los síntomas pueden ir aumentando con la edad aunque actualmente existen diversas técnicas quirúrgicas para paliar las posibles secuelas. Ejemplos de NTDs cerrados son la espina bífida oculta o el síndrome de la médula espinal anclada (McComb 2015).

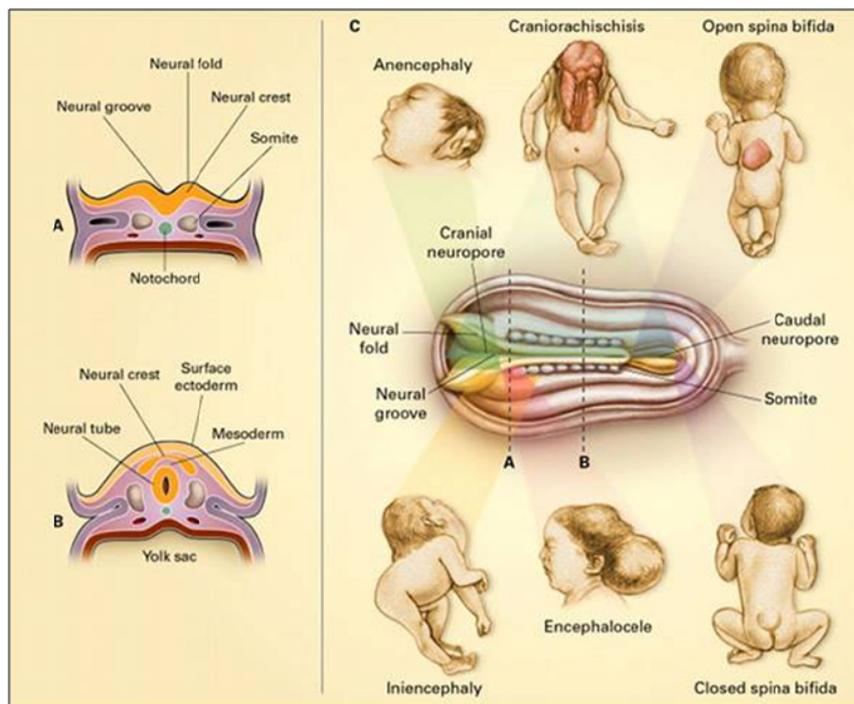


Figura 1- Clasificación de los distintos tipos de defectos del tubo neural

### **1.1. Desarrollo del tubo neural en la embriogénesis**

La formación del tubo neural en etapas embrionarias recibe el nombre de neurulación. La neurulación se divide en dos fases: La primera ocurre durante las semanas 3 y 4 de gestación y consiste en la formación del cerebro y del tubo neural desde la región caudal hasta el nivel por encima del hueso sacro, la segunda etapa completa el sacro distal y las regiones del coxis (Padmanabhan 2006).

Los fallos en la primera neurulación son los que se asocian a los NTDs abiertos, como la anencefalopatía, el mielomeningocele y la exencefalia. Las condiciones de NTDs asociadas con lesiones en la cobertura de la piel situada en la estructura de la médula espinal, conocido como espina bífida oculta y el síndrome de la médula espinal anclada se clasifican dentro de los NTDs cerrados y se corresponden con un fallo en la segunda neurulación (Copp and Greene 2013; Puvirajesinghe and Borg 2015).

Las dos formas más comunes de NTDs en la clínica humana son la espina bífida y la anencefalopatía. Ambas malformaciones suelen producirse normalmente entre los días 21 y 28 de desarrollo (Botto, Moore et al. 1999) y, aunque se desconocen las causas exactas del desarrollo de este tipo de malformaciones congénitas se sospecha que se deben a una casuística multifactorial entre las que se encuentran factores genéticos y ambientales (Puvirajesinghe and Borg 2015).

A pesar de la elevada incidencia de los NTDs, afectando a uno de cada mil embarazos, y que estos defectos congénitos se han descrito desde la antigüedad, el conocimiento de las causas que los provocan y su prevención es hoy en día insuficiente (Copp and Greene 2013), por ello en los últimos años se han realizado diversos estudios dirigidos a elucidar qué factores pueden influir en la aparición de NTDs.

Hasta el momento, se ha descrito como una de las posibles causas el déficit de vitamina B9 (ácido fólico) en la alimentación materna, por ello, se sugiere que con una ingesta adecuada de ácido fólico, de, como mínimo, 4 mg/día por parte de la madre en los meses previos a la concepción y durante las primeras etapas del embarazo, podría prevenir al menos la mitad de los casos de NTD. (Lary and Edmonds 1996; Botto, Moore et al. 1999)

## 1.2. La espina bífida

La espina bífida, es una de las formas más frecuentes de NTD en bebés nacidos vivos y, al ser compatible con la vida, es la que más secuelas y morbilidad provoca en pacientes afectados de NTDs. La espina bífida es generalmente compatible con la supervivencia postnatal, pero conlleva un progresivo deterioro neurológico por debajo del nivel donde se localiza el defecto, que conlleva a la pérdida de sensibilidad, problemas locomotores y sensoriales y a la incontinencia de esfínteres.

Otras condiciones asociadas a la espina bífida incluyen hidrocefalia, cuyo tratamiento requiere una derivación del fluido cerebroespinal a través de una sonda intracraneal, además de deformidades vertebrales y desórdenes genitourinarios y gastrointestinales. En la *Figura 2* se puede observar la imagen del defecto lumbar en un recién nacido afectado de MMC (Copp and Greene 2013).



Figura 2- Recién nacido afectado de espina bífida. Fuente: Humpath.com

En la embriogénesis normal, la formación del sistema nervioso comienza cuando el embrión cambia de una organización circular a una axial, es entonces cuando comienza a formarse la primera estructura del sistema nervioso: la placa neural. En el siguiente paso, los límites de esta placa comienzan a curvarse hacia dentro hasta que se cierran totalmente; este proceso ocurre en dos estadios correspondientes a la primera y la segunda neurulación. La primera neurulación dará lugar al tubo neural del que después se desarrollará el cerebro y la mayor parte de la médula espinal. Tras la primera

neurulación, en los niveles más bajos del tubo neural, ocurre la segunda neurulación que dará lugar a la parte más inferior de la médula espinal y a la región sacra y caudal (Greene and Copp 2009). En la situación idónea, los arcos vertebrales migran dorsalmente rodeando el tubo neural cerrado, antes de diferenciarse a tejido cartilaginoso y óseo. Sin embargo, cuando el tubo neural no se cierra y permanece abierto, los tejidos de los arcos vertebrales son incapaces de cubrir el neuroepitelio y da lugar a la espina bífida debido a que la placa neural queda al mismo nivel que la piel, como se ilustra en la Figura 3.

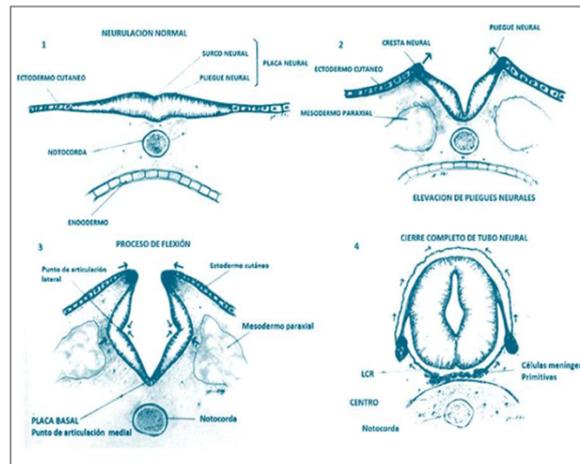


Figura 3- Proceso de neurulación primaria

En humanos la mayoría de casos de espina bífida son císticos, es decir, se produce una protuberancia formando un quiste en forma de saco en la zona del defecto localizado en la espalda del feto.

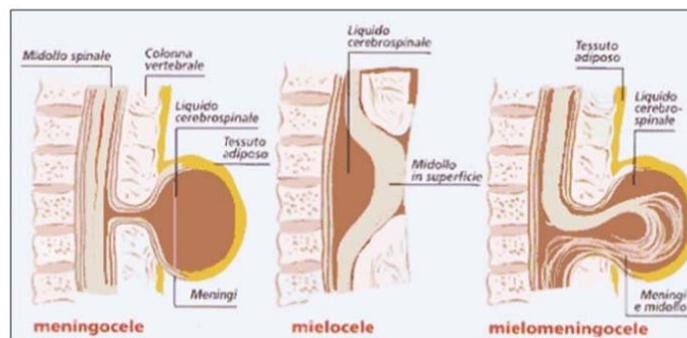


Figura 4- Tipos de espina bífida cística

En función del contenido de este saco se ha establecido una división práctica de los casos de espina bífida:

- a. Si en este saco están las meninges se denomina meningocele.
- b. Si está la médula ósea se conoce como mieloccele.
- c. Si en el contenido del saco se encuentran tanto las meninges como la médula ósea se denomina mielomeningocele (MMC).

Estos tres tipos de espina bífida cística se resumen en la Figura 4, donde se representan las diferentes formas de espina bífida dependiendo del contenido cístico y que establecen esta clasificación.

Existe un cuarto tipo de espina bífida, la espina bífida oculta. Es la menos grave de todas y, pese a que sí que existe un defecto en el cierre óseo, no aparece quiste ni hay daño en el tejido neural, por lo que en muchas ocasiones ni siquiera presenta síntomas.

La espina bífida oculta se asocia con duplicaciones medulares, teratomas o médulas espinales ancladas, a nivel superficial se pueden observar mechones de pelo densos en la zona lumbar donde existe el defecto y también hoyuelos cutáneos. (Montarini, 2002).

En la Figura 5 se puede observar una comparativa de los cuatro tipos generales de espina bífida.

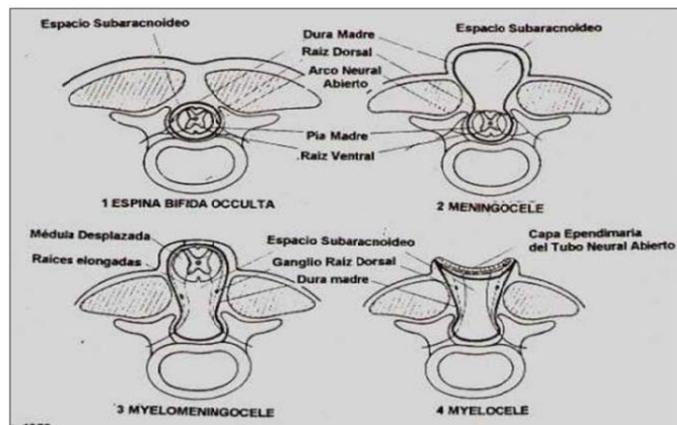


Figura 5- Afectación de la médula espinal en función del tipo de NTD. (Patten 1952)

El mielomeningocele (MMC) es el tipo de espina bífida más grave y representa un importante problema en la clínica pediátrica, ya que afecta aproximadamente a 3,3 de 10.000 nacimientos, y, aunque es compatible con la vida, el MMC afecta gravemente a la médula espinal y al cerebro (Lary and Edmonds 1996).

Dependiendo del nivel del defecto el MMC da lugar a diferentes patologías como paraplejía, hidrocefalia, deformaciones esqueléticas y retraso mental (Hunt 1990; Dias and McLone 1993). El MMC se detecta generalmente mediante ecografía o resonancia magnética (Figura 6) durante el control que se realiza a las 18-20 semanas de gestación.

Originalmente, se asumía que la espina bífida era la consecuencia de un defecto en la formación del tejido neural durante la primera neurulación, sin embargo, en los últimos años, diversos estudios han demostrado que el MMC es un proceso que ocurre en dos estadios diferenciados.

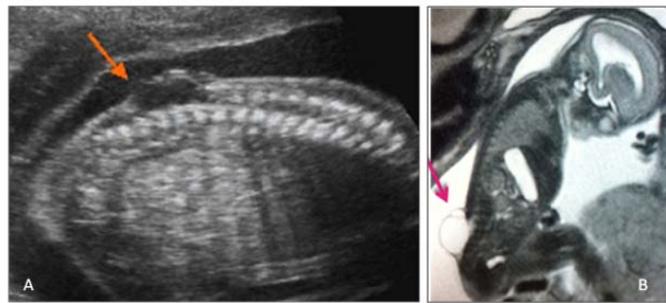


Figura 6-Métodos de diagnóstico de MMC: ecografía (A) y RMN (B)

Así, el primero de ellos se debe a un defecto de cierre y formación de las vértebras, músculo y piel en la zona del defecto que se produce durante el proceso de neurulación primaria; pero el daño sobre el tejido neural se produce por la exposición de la médula espinal al ambiente intrauterino y a un efecto tanto de erosión mecánica, al rozar con las paredes del saco amniótico, como química, al estar en contacto con el líquido amniótico (LA), lo que da lugar a un daño abrasivo y traumático. De esta manera, el daño sobre el tejido neural va aumentando de forma progresiva a medida que avanza la gestación, sufriendo incluso una lesión adicional en el momento del parto, cuando el feto debe atravesar el canal vaginal (Meuli, Meuli-Simmen et al. 1997; Meuli and Moehrle 2014).

La teoría de que el daño neural en fetos con MMC tiene un doble origen, está respaldada por diversos estudios entre los que destacan el de *Koreromp*, en el que se documentaron movimientos normales en las caderas y rodillas de fetos afectados por MMC en la semana 16-17 de gestación (Koreromp, van Gool et al. 1986), o el de *Sival*, que estudió el movimiento de fetos con MMC comparando los resultados con la función postnatal. En particular, el estudio de *Sival* observó que la mayoría de pacientes con MMC durante la gestación, presentaban un patrón de movimiento normal, sin embargo, en el momento del nacimiento todos salvo dos tuvieron malformaciones en las piernas, hallazgo que explican con el hecho de que este daño en la médula ocurrió mientras la gestación avanzaba y también en el momento del parto (Sival, Begeer et al. 1997).

Además de estos estudios, modelos de ratones con MMC inducidos mediante la administración de teratogénicos han demostrado que inicialmente el neuroepitelio que rodea la zona de la lesión es sano y que va degenerando conforme avanza la gestación (Stiefel, Copp et al. 2007). Por otro lado, se han realizado experimentos *in vitro* en los que se ponen en contacto tejido medular de rata con LA y se ha visto que éste es tóxico para la médula espinal (Heffez, Aryanpur et al. 1990; Drewek, Bruner et al. 1997). Se ha demostrado hasta tal punto la toxicidad del LA que se ha propuesto un cambio en su composición para disminuir el efecto tóxico del mismo sobre la médula (Olguner, Akgur et al. 2000).

Respecto al daño que puede causar el parto natural en niños con MMC se han realizado estudios en los que se ha visto una clara mejora de la función motora en función de si el feto afecto por MMC nació por parto vaginal o cesárea (Luthy, Wardinsky et al. 1991).

## **2. Terapias actuales para el MMC**

Actualmente, las alternativas al alcance de los padres a cuyo hijo se le ha diagnosticado un caso de MMC son limitadas. Una de ellas es la interrupción voluntaria del embarazo, si la ley lo permite en el país donde residen, y la otra pasa por realizar una intervención quirúrgica prenatal o postnatal para la corrección del defecto congénito. La cirugía prenatal se debe realizar cuando el feto aún se está desarrollando, con el consiguiente riesgo para la madre y el feto, y la cirugía postnatal se realiza tras esperar al momento del nacimiento para intervenir quirúrgicamente y cerrar el defecto.

## **2.1. Intervención quirúrgica pre- y post-natal**

Hace varias décadas, ante un caso de MMC si los padres decidían continuar con el embarazo, era necesario esperar al nacimiento del bebé para realizar una intervención postnatal. Debido a la agresividad que conlleva este tipo de intervención, un 14% de los niños operados postnatalmente no llegaban a los 5 años y este número aumentaba hasta el 35% si a la espina bífida le acompañaba la malformación de Arnold- Chiari II (Johnson, Sutton et al. 2003).

A estos porcentajes de esperanza de vida tan bajos que acompañaban a la intervención postnatal se sumó la teoría que postula que la gravedad del MMC aumenta conforme avanza la gestación, por ello, comenzó a tomar fuerza la posibilidad de operar al feto antes de su nacimiento mediante cirugía prenatal, con el objetivo de mejorar la supervivencia de estos niños y minimizar el daño neural que se producía durante la gestación.

Se realizaron diversos estudios comparativos entre los resultados con la cirugía pre y posnatal, de hecho, el Instituto Nacional de la Salud de EEUU conduce, aún en la actualidad, una serie de ensayos clínicos en un estudio prospectivo, randomizado y multicéntrico (Management of Myelomeningocele Study, MOMS: [www.bsc.gwu.edu](http://www.bsc.gwu.edu)) para determinar la eficacia de la reparación prenatal (Stiefel, Copp et al. 2007; Adzick, Thom et al. 2011).

Las impresiones de este estudio postulan una clara mejora de los niños nacidos a los que se les ha practicado la cirugía prenatal, evitando la colocación de una válvula intracraneal tras el nacimiento y mejorando sus capacidades neurológicas, incluyendo la posibilidad de caminar sin la ayuda de aparatos ortopédicos, además, se ha demostrado que la cirugía abierta en la etapa prenatal reduce la morbilidad neurológica postnatal (Adzick, Thom et al. 2011). Por ello, en base a los resultados positivos, la intervención prenatal está cobrando fuerza respecto a la intervención posnatal de los recién nacidos.

Idealmente, la intervención prenatal se debe realizar entre las semanas 19 y 25 de gestación (Adzick 2010). Consiste en realizar una apertura abdominal y uterina de la madre, exponer la zona lumbar del feto y, en la lesión de MMC, practicar una disección de la placoda, el cierre de la dura y una sutura multicapa.

En la Figura 7 se pueden observar algunas de las etapas de la cirugía fetal abierta actual, donde se ha añadido la cobertura del defecto con un parche y un sellante biológico.

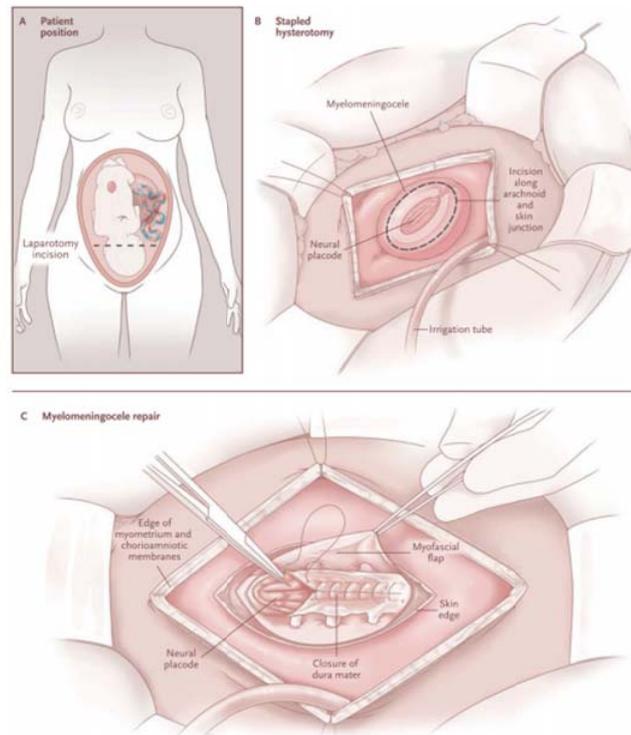


Figura 7- Imágenes de la reparación de MMC mediante cirugía prenatal abierta. Colocación de la madre (A), exposición de la zona lumbar del feto (B), reparación del MMC.

De esta manera, se evita el empeoramiento del daño medular por interacción con el líquido amniótico, aunque el daño previo que se haya producido hasta el momento de la cirugía es ya irreparable (Fontecha, Peiro et al. 2011). Así, se ha demostrado que los fetos intervenidos antes de las 25 semanas de gestación presentan una clara mejora en la función sensorial y motora y también una minimización de la hidrocefalia y de la malformación de Chiari II. Sin embargo, si la cirugía se practica cuando el embarazo está más avanzado y la degeneración de la médula ya ha comenzado, estas funciones son ya irrecuperables (Bruner, Tulipan et al. 1999; Sutton, Adzick et al. 1999; Li, Gindler et al. 2003; Watanabe, Li et al. 2016).

Pese a las claras ventajas que, a priori, podría presentar la cirugía prenatal, aún se encuentran en fase de evaluación las ventajas que genera y que justifiquen la decisión de realizar esta intervención. Primeramente, porque el MMC no es una enfermedad letal, por lo que algunas familias consideran la intervención como un riesgo añadido, además, el estudio del MOMS aún se está llevando a cabo y las conclusiones derivadas del mismo se pueden considerar tempranas. Por otro lado, se necesitaría un mayor número de casos para que los resultados fuesen totalmente concluyentes, y un seguimiento postnatal de estos fetos intervenidos. Además, esta técnica de reparación fetal no está disponible en todos los países al carecer de personal especializado en cirugía fetal, por lo que no todas las familias la tienen a su alcance (Al-Shanafey, Fontecha et al. 2013).

A esta situación se debe añadir que la cirugía prenatal, es evidente que conlleva también un riesgo potencial para la morbilidad tanto materna como fetal debido a la laparotomía e histerectomía que se lleva a cabo durante la intervención. Entre las complicaciones que pueden surgir se incluyen la prematuridad, la ruptura de membranas, la ruptura del útero y hemorragias maternas y una posible afectación que esta cirugía abierta puede tener para embarazos futuros.

## **2.2. Sellantes y fetoscopia**

A causa de las complicaciones que pueden ocurrir en una intervención mediante cirugía prenatal abierta, en los últimos años se ha estado desarrollando la utilización de la fetoscopia, la cual consiste en realizar la intervención quirúrgica mínimamente invasiva mediante el uso de un fetoscopio introducido a través de una pequeña incisión en el abdomen materno. La fetoscopia se postula como una excelente alternativa a la cirugía abierta, y se está alzando como la técnica más adecuada para las intervenciones prenatales, reduciendo la morbilidad materna y fetal (Peiro, Fontecha et al. 2013).

Ya en los años noventa se empezó a pensar en la sutura de la lesión mediante la fetoscopia como una posibilidad para la terapia de MMC (Bruner, Tulipan et al. 2000) y años más tarde se añadió la posibilidad de cerrar el defecto mediante un parche, suturando también la piel sana de alrededor del defecto al parche para evitar que éste se moviese (Kohl, Hering et al. 2006; Kohl,

Tchatcheva et al. 2009) sin embargo, estas aproximaciones incluían un cierre final en multicapa, lo que conllevaba a una elevada manipulación del feto.

Por ello, en los últimos años se han desarrollado nuevos métodos de cierre con un manejo menos invasivo para el feto, como el uso de sellantes biológicos, los cuales ya han sido ensayados con éxito en modelos animales (Fontecha, Peiro et al. 2009) para el tratamiento del MMC. Este nuevo método de cierre del defecto congénito, consiste en la cobertura del defecto mediante la aplicación de una membrana biocompatible la cual se fija con un sellante quirúrgico, minimizando así la manipulación del feto y reduciendo considerablemente los riesgos tanto fetales como maternos (Fontecha, Peiro et al. 2011).

Pese a todos los esfuerzos realizados en la investigación de la cirugía prenatal para poder reducir los riesgos de la intervención y conseguir aumentar la calidad de vida de los pacientes con MMC, a la edad gestacional a la que se realiza la reparación no es posible revertir los daños neuronales ya causados, ni tampoco se ha conseguido una prevención total de la malformación de Arnold Chiari II, relacionada directamente con el MMC.

Con esta situación, un objetivo a asumir en la terapia de esta enfermedad sería, a la vez que se repara el defecto del MMC poder regenerar, en el momento de la intervención, las estructuras de la médula espinal que hayan sido dañadas previamente. En este aspecto, la medicina regenerativa se está abriendo como un campo de investigación muy importante ya que permitiría la reparación del tejido medular dañado mediante la aplicación de células madre en el momento de la intervención prenatal.

### **3. Bioingeniería celular y tisular**

La ingeniería celular y tisular es un campo que forma parte de la medicina regenerativa y que está adquiriendo mucha fuerza en los últimos años como terapia alternativa para una multitud de enfermedades. Se basa en la utilización de células y tejidos que provengan del mismo paciente, de un donante o incluso de células creadas *in vitro* para reparar o prevenir algún daño en el organismo.

El objetivo de la medicina regenerativa es restablecer la función de un órgano o tejido en pacientes con enfermedades graves y cuyo organismo no es

capaz de curar. Actualmente, esta nueva rama de la medicina utiliza células madre para crear tejidos vivos y funcionales para reparar tejidos y órganos dañados por diversas patologías, defectos congénitos o por la edad.

Las células madre tienen la capacidad de actuar sobre las áreas dañadas y regenerar el tejido con células nuevas y de esta manera restaurar la funcionalidad. Un ejemplo de utilización de la medicina regenerativa actual sería el trasplante de médula ósea o algunas terapias que se basan en derivar células madre a partir de la sangre del cordón umbilical.

### 3.1. Las células madre

Uno de los puntos claves de la medicina regenerativa son las células madre. Las células madre para ser caracterizadas como tal, deben cumplir tres características: Tener la capacidad de regenerar su propia población celular (*self-renewing*), tener una elevada capacidad de proliferación y además deben ser capaces de poder diferenciarse a diferentes tipos celulares con propiedades diversas. El esquema en el que se basa la terapia con diferentes tipos de células madre se puede observar en la Figura 8.

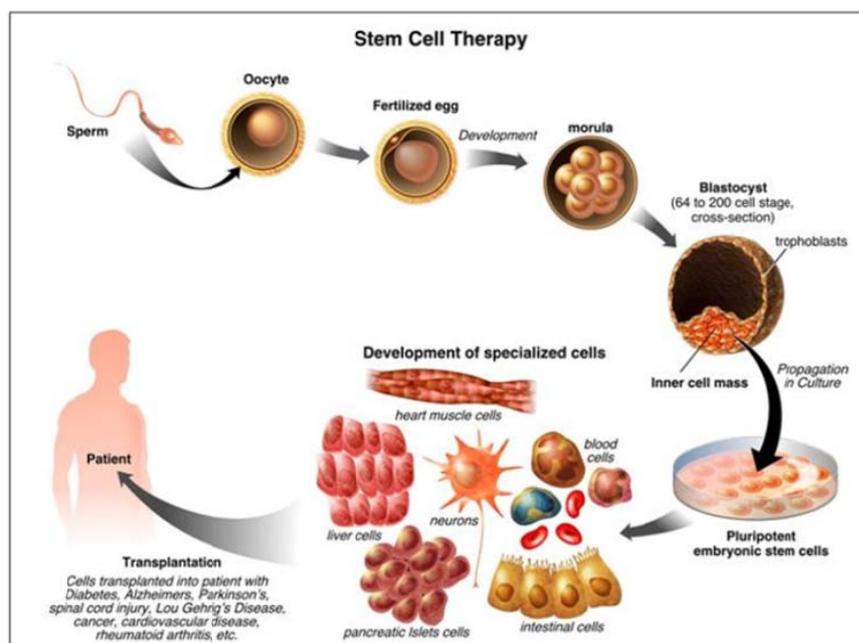


Figura 8- Esquema de potenciales estrategias en terapia celular y medicina regenerativa

Esta capacidad de proliferación y diferenciación de las células madre es, a su vez, su criterio de clasificación, y, por ello, en función de su potencialidad, podemos distinguir los siguientes tipos de células madre:

Células madre totipotenciales: Están presentes en el estadio embrionario de mórula y pueden generar cualquier tipo de célula. Son capaces de generar un individuo completo si son trasplantadas *in utero*.

Células madre pluripotenciales: Células de origen embrionario, fetal, procedentes del líquido amniótico o modificadas genéticamente (células madre pluripotenciales inducidas, iPSCs) que pueden generar cualquier célula que provenga de las tres capas embrionarias (mesodermo, endodermo y ectodermo), es decir, cualquier tipo de célula del tejido adulto y algunos tipos embrionarios (cuerpos embrionarios).

Células madre multipotenciales: Están presentes en la médula ósea, en la sangre o en tejidos adultos y son capaces de diferenciarse a varios tipos de linaje celular. Pueden generar varios tipos celulares adultos.

Células madre oligopotentes: Tienen la habilidad de diferenciarse en células de su propio tejido, o de linajes celulares similares.

Células madre unipotenciales: Localizadas en los tejidos adultos. Únicamente pueden generar células de un linaje específico, pero tienen la propiedad de auto-renovarse (requisito indispensable para caracterizar a una célula madre).

Uno de los tipos celulares más prometedores en el campo de la medicina regenerativa son las células madre embrionarias (ESCs); sin embargo, conseguir células de este tipo es muy difícil dado que se deben extraer de mórulas en desarrollo y además de las dificultades técnicas de obtención y manipulación, a las ESCs les acompañan numerosos problemas éticos de utilización a causa de su origen embrionario y a su elevada potencialidad de crecimiento que podría provocar la aparición de tumores. Por ello, actualmente, las células más utilizadas en medicina regenerativa son las células madre multipotenciales somáticas debido a que es relativamente fácil conseguirlas y además no conllevan tantos problemas éticos, legales o religiosos como las células embrionarias.

### 3.1.1. Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales (MSCs) son una población de células madre pluripotentes con la capacidad de diferenciarse a una gran variedad de tejidos de origen mesenquimal entre los que se incluyen el hueso, el cartílago, el músculo, tendón y una elevada variedad de tejidos conectivos (Pittenger, Mackay et al. 1999; Tsai, Lee et al. 2004).

Las MSCs presentan una morfología característica en forma de huso cuando se encuentran indiferenciadas. Se han identificado MSCs en muchos tejidos humanos como en la médula ósea, en sangre periférica tanto adulta como fetal, hígado, placenta, el bazo fetal y el tejido adiposo (Zuk, Zhu et al. 2002; Bieback, Kern et al. 2004; Fukuchi, Nakajima et al. 2004; De Coppi, Bartsch et al. 2007; Gargett, Schwab et al. 2009).

El potencial terapéutico de estas células en enfermedades neurológicas reside en la capacidad de diferenciarse hacia linajes neurales y también en los efectos paracrinos que pueden tener en la regeneración tisular y en la modulación de la respuesta inmune (Hung, Chen et al. 2002; Hermann, Gastl et al. 2004; Yi, Lee et al. 2012).

La presencia de MSCs ha sido descrita en muchos tejidos, incluido el LA humano. Las MSCs ya han demostrado diversas propiedades terapéuticas, como por ejemplo, el cierre a nivel epitelial del defecto del MMC en modelo de rata tras su inyección en el saco amniótico de fetos con MMC (Dionigi, Ahmed et al. 2015).

### 3.1.2. Células Madre Mesenquimales del LA

Hace ya algunos años que se evidenció la existencia de células madre en el líquido amniótico. Estas células tienen las mismas características que las MSCs, sólo que derivadas del líquido amniótico y son conocidas como *amniotic fluid mesenchymal stem cells* (afMSCs) (Kaviani, Guleserian et al. 2003). Las afMSCs presentan marcaje positivo para Oct4 o c-Kit, los cuales son típicos marcadores de pluripotencialidad y definen un potencial uso terapéutico en el campo de la medicina regenerativa. Estas células provienen del feto en desarrollo y se observó que son capaces de diferenciarse hacia células del linaje hematopoyético, neurogénico, osteogénico, condrogénico y adipogénico bajo determinadas condiciones de inducción, por lo que las afMSCs aparecen con unas propiedades similares a las ESCs, si bien es cierto que su papel biológico

aún no está claramente descrito (McKay 1997; Prusa, Marton et al. 2004; Tsai, Lee et al. 2004; De Coppi, Bartsch et al. 2007; Rosner, Schipany et al. 2012).

En base a estos datos, el LA se ha postulado como una nueva fuente de células de origen fetal con múltiples propiedades terapéuticas para un posible uso en el tratamiento de diferentes malformaciones congénitas, así como la obtención de células para ingeniería tisular.

Las afMSCs se han impuesto como una útil herramienta en la ingeniería tisular por diversos motivos, el primero de ellos es su fácil obtención ya que el líquido amniótico se puede obtener de manera muy sencilla a partir de una amniocentesis practicada a la madre, y que comporta un riesgo muy bajo de problemas en la gestación (Kaviani, Perry et al. 2001). Por el contrario, la obtención de MSCs a partir de otros tejidos es mucho más compleja, como por ejemplo, para obtener células de la médula ósea se requiere un método invasivo de punción intra-ósea. Además, se ha demostrado que las afMSCs participan en el cierre de heridas fetales y también se ha observado que se pueden llegar a diferenciar a neuronas, oligodendrocitos y astrocitos en modelos animales (Kakishita, Nakao et al. 2003), por lo que pueden ser idóneas para reparar tejidos dañados en fetos con malformaciones congénitas.

Comparando las afMSCs con otras MSCs obtenidas de la médula ósea o de la sangre del cordón umbilical se ha observado que las primeras crecen hasta dos veces más rápido en cultivo bajo las mismas condiciones, es decir, tienen una cinética de crecimiento muy particular y que permite tener un elevado número de células en poco tiempo, lo cual es de gran importancia en medicina regenerativa y, en particular, si se diseña una estrategia de trasplante autólogo con células del propio paciente (Dionigi, Ahmed et al. 2015).

Las características de potencialidad de las afMSCs son similares a las que tienen las células embrionarias, pero, la obtención y utilización de estas últimas conllevan un menor inconveniente en cuanto a problemas éticos. Por tanto, dada la facilidad de obtención y manipulación de las afMSCs, y al evitar problemas éticos, la utilización de estas células pueden proporcionar las mismas ventajas que las ESCs pero evitando los inconvenientes derivados del uso de células embrionarias. Otra de las ventajas que presentan las afMSCs es que se pueden obtener en las primeras fases de la gestación por lo que pueden servir para un trasplante autólogo antes o después del nacimiento en caso de que se requiriese.

### **3.1.3. Células Madre Neurales (NSCs)**

La cirugía de corrección prenatal del MMC ha tenido un auge importante en los últimos años y, actualmente es una práctica extendida en la clínica humana para el tratamiento del MMC. Sin embargo, pese a que se han descrito los posibles beneficios de esta intervención, como la prevención de la colocación de una válvula para disminuir la herniación ventricular o la de producir una mejora en la función neurológica, tiene también algunas limitaciones y no todos los pacientes pueden beneficiarse de esta reparación debido a los estrictos criterios de inclusión.

Además, se debe añadir que los pacientes a los que se les ha sometido a la reparación prenatal no han tenido aún un seguimiento a largo término, y que, pese a que en el momento neonatal se podía ver la mejora de algunas de las funciones, hay algunas de ellas, sobre todo neurológicas, que no se recuperan en todos los casos, quedando secuelas permanentes (Johnson, Sutton et al. 2003). Esto se debe principalmente a que, si bien es cierto que con la reparación prenatal se evita el daño neural causado por la interacción con el ambiente intrauterino y el progresivo deterioro del tejido, la intervención quirúrgica para la corrección del defecto se lleva a cabo entre la semana 21- 26 de gestación y el daño de la médula espinal que se produce hasta el momento de la intervención no se repara. Además, tampoco existe actualmente una terapia farmacológica para tratarlo, por lo que en los últimos años está adquiriendo fuerza la utilización de la medicina regenerativa mediante el trasplante celular para reparar el daño en el tejido neural de la médula espinal que se ha producido previamente a la intervención y así poder alcanzar en estos pacientes unos niveles neurales, sensoriales y locomotores similares a los de un niño sano (Bottai, Scesa et al. 2014).

En caso de plantear una posible terapia basada en la medicina regenerativa para la reparación del tejido neural, y tal y como se ha descrito en numerosos estudios previos en modelos animales (Cummings, Uchida et al. 2005; Vishwakarma, Bardia et al. 2014; Doepfner, Traut et al. 2016) el tipo celular más especializado para reparar el tejido neural son las células madre neurales (NSCs). Las NSCs son células diferenciadas al linaje neural y aunque han perdido la capacidad pluripotencial, son células madre especializadas en la generación de células específicas del sistema nervioso, tales como neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Weiss, Reynolds et al. 1996; Reubinoff, Itsykson et al. 2001; Vishwakarma, Bardia et al. 2014). Las NSCs se localizan en el sistema

nervioso central (CNS), mantienen la capacidad de *self-renewing* y son altamente especializadas en diferenciarse hacia células del linaje neural.

En general, las NSCs son unas células de difícil obtención y manipulación. En mamíferos adultos hay varias fuentes de NSCs: la zona subgranular del hipocampo, la zona subventricular del cerebro anterior (SVZ), el tejido encefálico o la médula espinal (Vescovi, Parati et al. 1999; Gonzalez-Perez 2012). Sin embargo, las características de las NSCs conseguidas varían mucho, ya que depende de la edad del donante, la viabilidad y la contaminación de la muestra, entre otros factores.

Como dato importante, cabe destacar que se han encontrado NSCs en el LA de fetos con MMC, de manera que se han descrito numerosos protocolos de derivación de NSCs a partir del LA de fetos con algún tipo de NTD, llegando, incluso a conseguir la diferenciación hacia los tres linajes neurales. Estas NSCs se han encontrado en el LA de fetos afectados con NTDs y no en LAs de sanos, lo que corrobora el hecho de que el LCF se mezcla con el LA en fetos que presentan este tipo de patologías (Turner, Klein et al. 2013).

Las NSCs crecen como neuroesferas en suspensión y presentan una elevada capacidad de proliferación y diferenciación *in vitro*, generando de manera muy eficaz los diferentes subtipos neurales (Begum, Guoynes et al. 2015). Uno de los inconvenientes de su uso es conseguir que las NSCs se mantengan indiferenciadas a partir de cultivos primarios ya que son muy sensibles a las condiciones de crecimiento, afectándoles todo tipo de factores, como el tipo de medio de cultivo, el ambiente externo, la superficie con la que puedan estar en contacto o el nicho que las rodee (Chang, Su et al. 2015; Hrebikova, Cizkova et al. 2015).

Las características y dificultad de obtención de las NSCs hacen que sus aplicaciones terapéuticas presenten algunas limitaciones, que ya se han tratado de evitar mediante el establecimiento de líneas celulares de NSCs inmortalizadas (Ryder, Snyder et al. 1990; De Filippis, Ferrari et al. 2008). Estas líneas inmortalizadas presentan una mayor velocidad de proliferación que las NSCs obtenidas directamente de pacientes y continúan teniendo la habilidad de diferenciarse a los tipos celulares neurales. Sin embargo, implican un elevado riesgo asociado en su uso en aplicaciones médicas debido a la utilización de oncogenes y vectores virales para su establecimiento.

También se han generado otras líneas inmortalizadas de NSCs a partir de células embrionarias o de *stem cells* pluripotenciales, (Reubinoff, Itsykson et al. 2001; Zhang, Wernig et al. 2001; Chambers, Fasano et al. 2009) pero, el alto grado de indiferenciación y pluripotencialidad de estos tipos celulares puede conllevar una mayor dificultad en dirigir las células hacia la regeneración de tejidos específicos, e incluso puede conllevar un riesgo de formación de teratomas al ser trasplantadas.

A pesar de las dificultades en la obtención y uso de las células madre, en los últimos años, las terapias en las cuales se intenta regenerar la zona dañada mediante tejidos biocompatibles o tejidos trasplantados con NSCs han adquirido mucha importancia. En estos estudios se ha demostrado la capacidad de las NSCs para poblar nichos neurales en desarrollo o dañados, además de su capacidad para diferenciar hacia cualquier célula de linaje neuronal y/o glial, lo que las convierte en las candidatas ideales para el desarrollo de una posible terapia en el tratamiento del MMC. También se ha demostrado que las NSCs son capaces de migrar y repoblar el subtipo celular del que hay una deficiencia o sustituir aquellos tipos celulares que no son adecuados por otros más apropiados (Yandava, Billingham et al. 1999; Hosseini, Farahmandnia et al. 2015). Adicionalmente, se ha descrito que el injerto de NSCs en el CNS puede inducir a la reparación y a la recuperación funcional después de un daño en el CNS, no sólo formando nuevas neuronas sino liberando factores tróficos y de protección contra el daño neural en el área de la zona dañada (Reynolds and Weiss 1992).

#### **3.1.4. Células Progenitoras Neurales (NPCs)**

El sistema nervioso tiene una limitada capacidad de auto-renovarse debido a que el tejido nervioso maduro está conformado por células completamente diferenciadas, y que han perdido la capacidad de regenerarse. Sin embargo, en los últimos años se ha investigado profundamente sobre la neurogénesis y la presencia de NSCs en el humano adulto.

Los primeros trabajos sobre la biología de las NSCs son de *Sally* en el 1989, donde se describieron algunas áreas concretas del cerebro de los ratones donde había una población celular neural con capacidad de auto-renovación. Posteriormente, en el 1992, *Reynolds* y colaboradores, describieron el procedimiento para aislar células madre neurales de la zona subventricular (SVZ) de tejidos adultos, mediante un protocolo que denominaron "Ensayo de

neuroesferas” (Reynolds and Weiss 1992). En este ensayo se disoció tejido del sistema nervioso central y se seleccionaron las poblaciones celulares que formaban colonias indiferenciadas y crecían en suspensión; además en el cultivo las células más diferenciadas morían, y, sin embargo, observaron que permanecían dos tipos de poblaciones: las neuroesferas que crecían en suspensión y que se auto-renovaban y otro tipo celular, que eran producto de las primeras, crecían adheridas a la base de la placa de cultivo y que eran capaces de generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Este segundo tipo celular también presentaba, aunque en menor medida que las NSCs, la capacidad de auto-renovarse y de diferenciarse a células de linaje neural. A esta nueva población celular la denominaron células progenitoras neurales (NPCs).

Como se observa en la Figura 9, las NPCs se generan a partir del proceso de diferenciación de las NSCs. El proceso de generación de NPCs se lleva a cabo a partir de dos tipos diferentes de mitosis por parte de las NSCs: divisiones simétricas, donde la progenie resultante mantiene las características de célula madre y las divisiones asimétricas, de las que se generan las NPCs. Las NPCs son células que ya no crecen en suspensión ya que conservan una elevada velocidad proliferativa y presentan una gran capacidad de diferenciarse a neuronas, oligodendrocitos y astrocitos (Weiss, Reynolds et al. 1996; Reubinoff, Itsykson et al. 2001; Vishwakarma, Bardia et al. 2014).

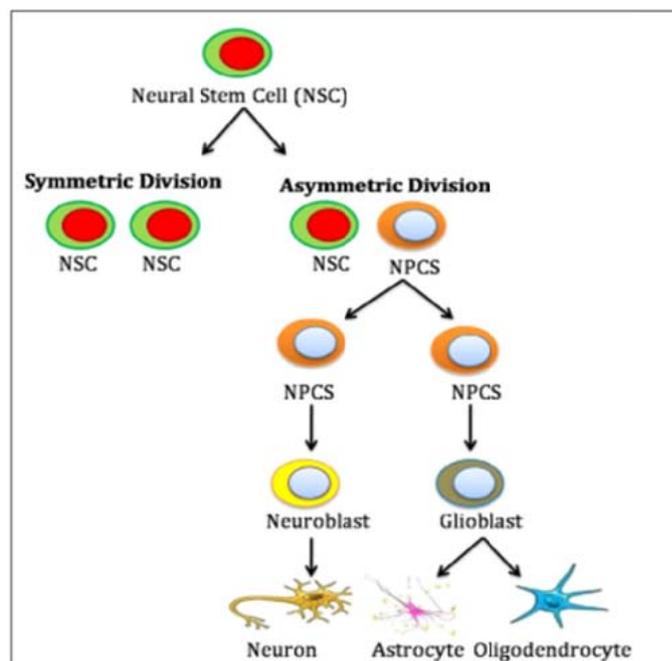


Figura 9- Proliferación y diferenciación de las NSCs (Vishwakarma, Bardia et al. 2014)

Aunque el origen de las NPCs es todavía incierto, actualmente hay descritas tres zonas del cerebro adulto donde pueden encontrarse, coincidiendo con los nichos dónde también se encuentran las NSCs: La SVZ del ventrículo lateral, la capa germinal externa del cerebelo y la zona subgranular del giro dentado. Dado que se generan a partir de las NSCs y, aunque las NPCs tienen diferentes características, desde el punto de vista de la medicina regenerativa las convierten en unas candidatas muy interesantes para la terapia de diferentes enfermedades del SNC. Pese a que las NPCs se producen endógenamente y tienen unos ratios de supervivencia y diferenciación más reducidos que las NSCs, se postulan como una interesante herramienta terapéutica para su administración exógena en zonas dañadas del tejido neural debido a sus características de célula madre multipotencial y a su elevada especialización para la generación de células del linaje neural (Florio and Huttner 2014). En la Figura 10 se puede ver la estructura de la SVZ humana y la distribución celular en la misma.

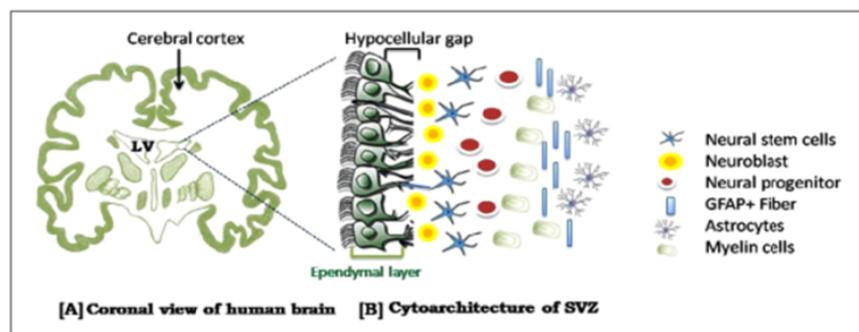


Figura 10- Estructura del SVZ y distribución celular (Vishwakarma, Bardia et al. 2014)

Se han llevado a cabo una elevada cantidad de estudios en diversas lesiones del sistema nervioso y en diferentes modelos animales en los que se ha realizado el trasplante de NPCs. Todos concluyen en que las NPCs son capaces de sobrevivir, diferenciarse e integrarse en el parénquima neural dañado, lo que lleva a una recuperación motora, sensorial y funcional. Además, las NPCs expresan diferentes citoquinas con propiedades terapéuticas que ayudan a disminuir los síntomas de las enfermedades en las que se han probado (Mitsui, Shumsky et al. 2005; Hjelm, Grunseich et al. 2016; Jin, Bouyer et al. 2016). En la Tabla 1 se puede ver un resumen de las nuevas terapias basadas en ingeniería celular que se están llevando a cabo en la actualidad.

S.no.	Disease	Cause	Symptoms	Available treatments	New strategies for treatment
1	Parkinson	Degeneration of dopaminergic neurons	Hypokinesia, Tremor, Rigidity, postural instability	DA Antagonists, Enzyme inhibitors, Deep brain stimulation, etc.	Transplantation of hNSCs or dopaminergic neurons into striatum or substantia nigra
2	Alzheimer	Impaired formation of hippocampal neurons in subgranular zone of the dentate gyrus	Memory impairment, cognitive decline, dementia	$\beta$ -amyloid immunotherapy	Transplantation of hNSCs or basal fibroblast producing NGF or BDNF
3	Spinal cord injury	Loss of neurons and glia, scar formation, demyelination	Loss of movement, sensation and control below the injured spinal segment	No pharmacological treatment	Transplantation of OPCs, BMSCs and hNSCs
4	Huntington	Defective huntingtin protein, Progressive neurodegeneration in striatum and cortex	Loss of motor function, decline in mental abilities and behavioral and psychiatric problems	Fluoxetine, sertraline, nortriptyline	Transplantation of hNSCs producing GDNF into the striatum
5	ALS	Weakness of cerebral cortex and brain stem muscles	Muscle atrophy and fasciculations, muscle spasticity, dysarthria, dysphagia	Riluzole (Rilutek), trihexyphenidyl or amitriptyline	Delivery of motor neurons, hNSCs and hMSCs at multiple sites along the spinal cord
6	Multiple sclerosis	Demyelination of neurons	Hypoesthesia, paresthesia, ataxia, dysarthria	Fingolimod (Gilenya)	Transplantation of hNSCs at the site of injury
7	Brain tumor	Uncontrolled cell division in brain	Intracranial hypertension cognitive and behavioral impairment	Surgery radiotherapy chemotherapy	Modified NSCs to produce necessary cytokines
8	Stroke	Ischemic	Formation of embolus in any part of the body which travels in the blood vessel	Tissue plasminogen activator (t-PA) and Aspirin	Cell replacement therapy using hNSCs or MSCs
		Ebolic	Formation of embolus in any part of the body which travels in the blood vessel		
		Thrombotic	Formation of clot within the blood vessel		
	Hemorrhage	Intracerebral bleeding caused by the rupture of a vessel in the brain			

Tabla 1- Ensayos clínicos que se están llevando a cabo en la actualidad con NSCs

En estos estudios basados en el trasplante celular se ha demostrado como las NPCs aumentan la supervivencia neural y reparan los tejidos del SNS, demostrando además la capacidad de remielinizar axones, lo que hace aumentar las posibilidades de tratar enfermedades cuya principal afectación sea la desmielinación axonal. Las NPCs son capaces de sobrevivir y diferenciarse aunque el ambiente en el que sean trasplantadas esté dañado y presente signos de inflamación y degeneración tisular (Cummings, Uchida et al. 2005). Las NPCs han demostrado además la capacidad de rescatar neuronas axotomizadas a partir de la muerte celular retrógrada, y la atrofia, reduciendo la formación de tejido cicatrizante y promoviendo la regeneración axonal (Lepore and Fischer 2005; Doeppner, Traut et al. 2016).

Aunque no se conocen claramente cuáles son los mecanismos por los que actúan las NPCs, sí se ha demostrado que son capaces de secretar factores neurotróficos (GDNF y BDNF), IGF-1 y VEGF, los cuáles protegen y aumentan la supervivencia de las motoneuronas y que podrían ayudar a prolongar la vida de las células trasplantadas en los animales utilizados como modelo de lesión. Estos factores también liberan moléculas antiinflamatorias que ayudan a aumentar la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, así como otras moléculas como BMP4, EGF, HGF, NGF y TGF $\beta$  que juegan papeles muy importantes. Sin embargo, son necesarios muchos más estudios para elucidar los mecanismos paracrinos de las NPCs en los tejidos del SNC.

Para clasificar las NPCs se utilizan distintos marcadores característicos para cada célula en función de su potencialidad y su nivel de diferenciación. Con estos marcadores definidos y la utilización de técnicas de inmunoselección se pueden seleccionar determinadas poblaciones de NPCs. El primer autor que describió la técnica de inmunoselección fue *Johansson* que utilizó un anticuerpo contra Notch1 para enriquecer de NSC un cultivo de cerebro de ratón. Posteriormente, *Uchida* y colaboradores llegaron a aislar una población celular enriquecida en NSC fetales mediante una selección con Cd133+, Cd34- y Cd45-, ya que se describió que las neuroesferas después de pases repetidos comienzan a producir células que presentan el antígeno Cd133+ en su superficie, lo que las hace únicas para separar del resto de población ayudando a una selección negativa para Cd34 o Cd45. En la Tabla 2 se puede observar un resumen de marcadores específicos para células del linaje neural (*Vishwakarma, Bardia et al. 2014*).

Type of cells	Positive markers	Negative markers
NSCs	Prominin-1 (CD133), CD56 (NCAM), Nestin, Sox-2, Oct-4, Notch-2, ABCB1, ABCG2, RBP1, RBP2, RBP7, HSPA4, HSPA9, HSPA14	CD34, CD45
Neuronal progenitors	PSNCAM, P75 Neurotrophin Receptor	-
Astrocytes progenitors	CD44, A2B5	-
Oligodendrocyte progenitors	NG2, PDGFR- $\alpha$ , Olig-2	-
Neurons	MAP-2, Doublecortin (DCX), $\beta$ -tubulin III, RNA Binding Protein (HuC), Neuro D, Neu N	-
Astrocytes	GFAP	-
Oligodendrocytes	Olig-1, Olig-4, Galactocerebroside (Gal C)	-

Tabla 2- Marcadores específicos de células del linaje neural. Fuente:(*Vishwakarma, Bardia et al. 2014*)

La Figura 11 complementa la tabla anterior; en esta figura se ve un esquema del proceso de diferenciación que siguen las células neurales y los marcadores que las caracterizan en cada una de las etapas.

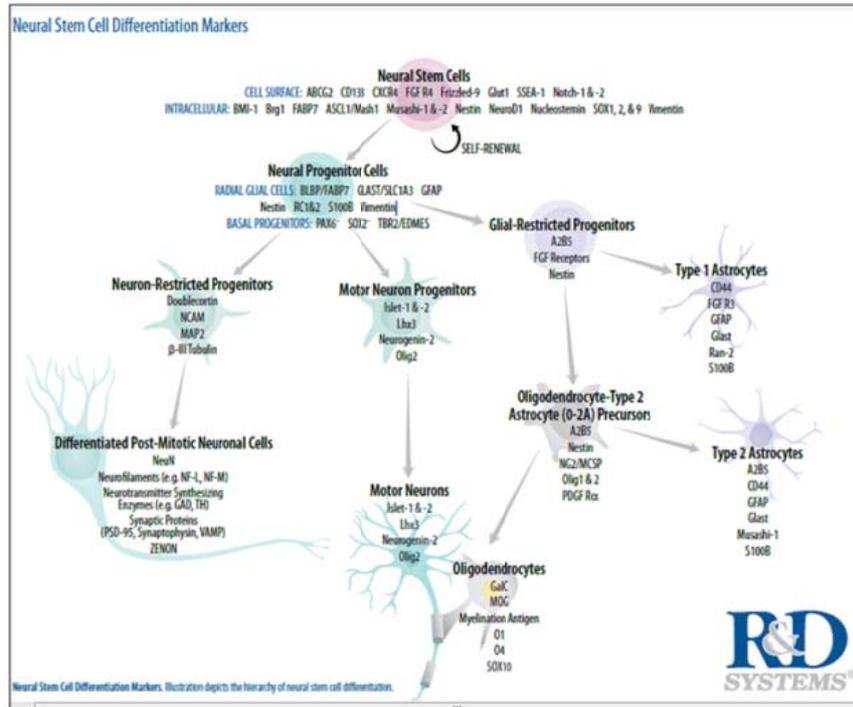


Figura 11- Marcadores específicos de células neurales. Fuente: R&D company

Para evaluar la capacidad de diferenciación de las NPCs, generalmente, se exponen a diferentes señales o a componentes de la matriz extracelular que les guían en su diferenciación, como la poly- L- ornithina, la laminina o el matrigel. Si bien es cierto que actualmente se han publicado diferentes protocolos específicos de diferenciación para conseguir células de linaje neural partiendo de distintas poblaciones de células progenitoras, quedan aún muchos aspectos que mejorar en esta línea de estudio. Uno de los puntos a clarificar es el patrón de marcadores característicos que presentan las células en función de su potencialidad y del momento de diferenciación en el que se encuentran, de esta manera se podrían identificar dentro de una población celular, aunque ésta fuese muy heterogénea o aunque las células a identificar fueran muy poco numerosas.

Como ya se citó anteriormente, en la SVZ del cerebro humano se encuentra una población de células con características de células madre, es decir, estas NPCs se pueden encontrar en el LCF del individuo, hecho que se

demonstró en el ensayo de *Reynolds* donde a partir de la SVZ mediante el “ensayo de neuroesferas” se consiguieron NPCs (Gonzalez-Perez 2012). Se ha descrito que las NPCs se pueden encontrar en el líquido cefalorraquídeo (LCF) de pacientes con hidrocefalia (Krueger, Wu et al. 2006), ya que en el cultivo de muestras de LCF de neonatos con hidrocefalia post-hemorrágica se han hallado células con marcaje positivo para Nestin y GFAP. La explicación que se le da a este hallazgo es que las NPCs pueden llegar hasta el LCF a través de las disrupciones del epéndimo que se dan en la hidrocefalia. Sin embargo, la cantidad de NPCs que se pueden recuperar del LCF son escasas (Krueger, Wu et al. 2006).

En el incesante estudio de las propiedades que tienen las células del líquido amniótico, se ha demostrado que existe *per se*, una población celular que tiene capacidades neurogénicas, es decir, que bajo los correctos medios de diferenciación pueden llegar a dar lugar a células de la estirpe neural (Prusa, Marton et al. 2004). Sin embargo, aunque esta capacidad neurogénica se pueda encontrar en las células que forman parte de los LAs en general, se ha descrito que los LAs obtenidos de pacientes con MMC o algún otro NTD, tienen una mayor cantidad de células positivas para GFAP (marcador neural) y que pueden diferenciarse en mayor cantidad a células del linaje neural (Danzer, Zhang et al. 2011; Maraldi, Bertoni et al. 2014).

Estas células con características de NSCs/NPCs que se encuentran en el líquido amniótico de pacientes con algún tipo de NTD y, especialmente con espina bífida, provienen del LCF que se han escapado al LA a través de la lesión producida por el defecto del tubo neural, lo cual corresponde con una de las características principales del MMC que es la pérdida de LCF a través del defecto congénito (Chang, Su et al. 2015), sin embargo, la proporción de estas NPCs depende de la dinámica del LCF y del tamaño y tipo del defecto (Pennington, Gray et al. 2013).

En células del LA procedente de pacientes con MMC se han descrito marcajes positivos de proteínas del desarrollo del tubo neural como BMP4 y Shh, además de una elevada cantidad de células positivas para GFAP, Sox2 y Cd133, lo que corrobora la presencia de NPCs en LAs de pacientes con NTD (Golob, Paige et al. 2008; Tsurubuchi, Ichi et al. 2013).

### 3.2. Scaffolds

Una vez establecido qué células serían las idóneas para trasplantar a la zona lesionada de MMC, éstas se tienen que integrar dentro de un vehículo, el cual se denomina en inglés *scaffold*.

En ingeniería tisular hay diferentes modelos de *scaffold* en función de si contiene o no células, de los componentes de los que está hecho o de la consistencia y propiedades físico-químicas. El *scaffold* ideal sería aquel que permitiese una máxima adherencia celular y crecimiento vascular, pero sin comprometer la elasticidad de las células y debe servir como un soporte funcional y estructural para las células (Kaviani, Guleserian et al. 2003).

Evans y colaboradores, en su estudio del 2000, identificaron los cuatro componentes necesarios para un *scaffold* óptimo para utilizar en el tejido nervioso y sería aquel que tenga: factores de crecimiento, matriz extracelular (ECM), soporte celular y moléculas que promuevan la regeneración axonal (Evans 2000). El *scaffold* se puede utilizar para que las células sean capaces de injertarse tanto entre ellas como con el tejido huésped, además sirve para evitar la cicatriz glial, que está descrito que inhibe la regeneración axonal (Skop, Calderon et al. 2016). Las interacciones entre la matriz extracelular que tiene el *scaffold* y las integrinas del tejido dirigirán la proliferación celular, la supervivencia y diferenciación.

Sin embargo, dependiendo de la zona a reparar, el *scaffold* deberá cumplir unas determinadas características para ayudar a la supervivencia y diferenciación correcta de las células *in vivo*. Hay diferentes estudios relacionados con la repoblación celular, sobre todo, después de una lesión aguda de la médula espinal, en los cuales se describe la arquitectura de las vías axonales. Esta arquitectura se pierde cuando se sufre un traumatismo, por lo que es necesario que el *scaffold* que se utilice tenga la capacidad de guiar a las células por la vía correcta para la repoblación, actuando como un puente y formando una estructura en 3D. Además, se debe demostrar tanto *in vitro* como *in vivo* que el *scaffold* no sea tóxico y que las células puedan anidar en él de manera correcta (Zhu, Wang et al. 2010; Tian, Prabhakaran et al. 2015).

Vacanti y sus colaboradores, en sus estudios sobre ingeniería tisular dirigidos para reparar médulas que habían sufrido una lesión aguda desarrollaron un *scaffold* que simulaba la estructura de una médula espinal sana mediante un esqueleto de polímero artificial sembrado con NSCs. De esta

manera, la parte interna del *scaffold*, que estimulaba a la materia gris de la médula espinal, fue sembrada con NSCs y actuó tanto de soporte trófico como de emplazamiento celular. La parte externa del *scaffold* estimulaba la parte blanca de la médula, con poros orientados axialmente para ayudar a la guía de los cuerpos axonales; esta porción también tenía una porosidad radial que permitiría el transporte del fluido inhibiendo el crecimiento del tejido cicatrizante (Langer and Vacanti 2016).

### **3.3. Modelos animales de MMC**

Pese a que el MMC tiene una elevada incidencia y causa serios problemas a las personas que lo padecen, hay muchos aspectos de esta enfermedad que permanecen desconocidos. Por ello, para estudiar la patología del MMC desde diferentes enfoques, intentando elucidar hechos como el origen de la enfermedad, los mecanismos moleculares que intervienen en su origen y desarrollo e incluso diferentes terapias, son necesarios distintos modelos animales que simulen el MMC humano.

Hay diferentes tipos de patrones de MMC realizados en modelos de experimentación animal. Un primer tipo son aquellos basados en la creación quirúrgica del defecto que tienden a replicar el efecto del fallo en la primera neurulación en el MMC (Housley, Graf et al. 2000; Fontecha, Peiro et al. 2009), y, un segundo tipo de modelo de MMC, que son aquellos inducidos de manera congénita mediante la administración de teratogénos a la madre gestante (Danzer, Schwarz et al. 2005; Quemelo, Lourenco et al. 2007). Estos últimos reproducen el daño neural causado por los dos efectos, tanto el primer hecho del fallo de la neurulación como la interacción del tejido neural expuesto con el ambiente, sin embargo, este segundo tipo no imita tan bien la casuística del MMC en humanos y normalmente, en estos modelos animales, la espina bífida está acompañada por otros defectos del tubo neural.

#### **3.3.1. Modelo de MMC en roedores**

Tanto para los ratones como para las ratas se han descrito modelos de creación del MMC y otros NTDs, administrando ácido retinoico (RA) en diferentes fases de la gestación. En el caso de los ratones, se ha descrito que con la administración de 70mg/kg de RA en el día 7 de gestación se obtienen

elevados porcentajes de defectos en el tubo neural, defectos como los que se pueden observar en la Figura 12 (Quemelo, Lourenco et al. 2007).



Figura 12- Modelos de MMC en ratón (Stiefel, Copp et al. 2007; Escobedo, Contreras et al. 2013)

En el caso de las ratas, con la administración 60mg/kg el día 10 de gestación, también se consigue un elevado número de fetos afectados de NTD, como los de la Figura 13 (Danzer, Schwarz et al. 2005).

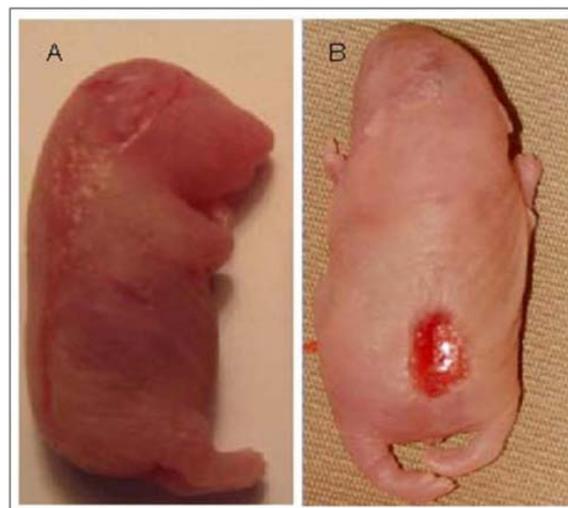


Figura 13- Modelo de MMC en rata. (Ma, Bao et al. 2012)

Además, se han descrito modelos de hámster en los que a las 10 horas de administrar 20.000 unidades universales de vitamina A a las madres gestantes se alcanzaban las mayores alteraciones a nivel mesodérmico de los embriones, causando un colapso de este tejido y derivando en el fallo del desarrollo del tejido neural (Marin-Padilla 1966).

El modelo de roedor tiene la ventaja de que el tiempo de gestación es muy corto lo que permite tener rápidamente resultados de los experimentos realizados, además de que las camadas obtenidas son muy grandes permitiendo restringir el número de animales utilizados en la experimentación y disminuyendo el número de madres gestantes. En cambio, son animales de pequeño tamaño, por lo que es difícil técnicamente trabajar con ellos y poder extrapolar adecuadamente los resultados a los humanos, dado que se han observado diferencias entre el desarrollo de ratones y humanos (Al-Shanafey, Fontecha et al. 2013). Otra de las desventajas que tiene el modelo de roedores es que es extremadamente sensible al momento en el que se administra el ácido retinoico, lo que produce que haya grandes diferencias en la literatura en lo referente a los ratios de dosis de RA *versus* tasas de defectos provocados (Danzon, Schwarz et al. 2005).

### **3.3.2. Modelo de MMC en aves**

Para inducir los NTDs en el modelo de pollo se han descrito en la literatura diferentes aproximaciones. Se puede inducir de manera mecánica, eliminando quirúrgicamente el tubo neural ya cerrado, o mediante la eliminación del albumen del huevo fertilizado o incluso inyectando la toxina del tétanos en el huevo (Pilowsky, Hodgson et al. 1982). En este estudio, además, se descubrió que en el LA de los embriones que presentaban defectos en el tubo neural había una elevada concentración de acetilcolinesterasa, enzima que se postula como un biomarcador para el diagnóstico de NTDs (Brennan, Jehanli et al. 1998; Dady, Havis et al. 2014; Flick, Krakow et al. 2014).

Otras maneras de inducir NTDs en el pollo es crear una ventana en el cascarón del huevo fertilizado, 26 horas después de la fertilización, o bien inyectando RA en el saco embrionario; también se ha demostrado que la inyección de elevadas dosis de progesterona puede dar lugar a la aparición de NTDs, lo cual se representa en la Figura 14 (Campbell, Ball et al. 1987; Kohga and Obata 1992; Pamir, Ali et al. 2006).

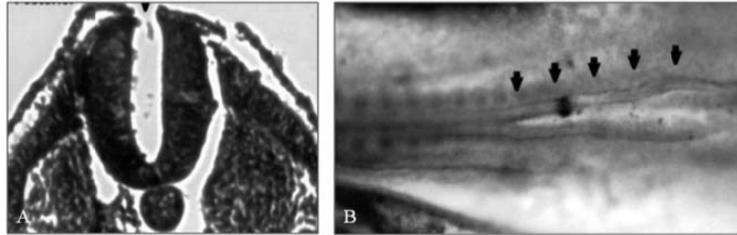


Figura 14- Modelo de MMC en pollo, corte sagital (A) y longitudinal (B). (Pamir, Ali et al. 2006)

El pollo es el modelo utilizado por excelencia en trabajos de investigación del desarrollo embrionario porque es muy fácil observarlo *in vivo* debido a la transparencia de membranas, además requiere un manejo muy sencillo y dado el periodo de incubación corto permite analizar los resultados rápidamente. Respecto a la formación del tubo neural en el pollo es muy similar al desarrollo en el humano, por lo que el estudio del mismo puede ser clave para el entendimiento del proceso en los humanos.

### **3.3.3. Modelo de MMC en lagomorfos**

Hace algunos años se publicó un modelo de MMC en conejo en el cual se postulaba como un buen modelo para el estudio de esta patología (Housley, Graf et al. 2000).

Este modelo ha sido utilizado para diferentes estudios, en concreto, nuestro grupo de investigación realizó un trabajo en el que se estudiaba el efecto de la interacción con el LA de la médula expuesta y también la acción de los esteroides en el parto prematuro. En este modelo, en el día 23 de gestación se realizaba una laparotomía a la hembra gestante y se exponían ambos cuernos uterinos. Se realizaba una histerectomía y se creaba el defecto espinal mediante la escisión de los arcos posteriores de las tres últimas vértebras lumbares, tras la apertura de la duramadre se exponía el tejido neural, permitiendo el flujo hacia el exterior del líquido cefalorraquídeo.

Posteriormente, a día 29 de los 30 que dura la gestación en lagomorfos, se realizaba una cesárea para poder recoger las muestras del estudio (Fontecha, Peiro et al. 2007) en la Figura 15 se puede observar el momento de creación del defecto de MMC (A) y el estado de la lesión cuando el feto nace (B).



Figura 15- Creación de la lesión en feto de conejo (A) Lesión de MMC en feto de conejo nacido (B)

Este modelo tiene un coste relativamente bajo, además, por una madre gestante se obtiene un elevado número de crías, aunque menor que en los roedores. El tiempo de gestación es más largo que en roedores, pero el tamaño de las crías es más grande, por lo que facilita la manipulación tanto de los fetos como de los recién nacidos, además de una más fácil evaluación macroscópica de los defectos causados por la lesión.

#### **3.3.4. Modelo ovino de MMC**

El modelo de creación de la lesión del MMC en el modelo ovino ha sido ampliamente utilizado. Generalmente, cuando la oveja gestante alcanza el día 70-72 de gestación se le practica una laparotomía y se realiza una histerectomía. El líquido amniótico de la bolsa es extraído mediante una punción para disminuir la presión de la bolsa y poder realizar la incisión con mayor facilidad.

Una vez la zona lumbar del feto es expuesta se escinden los músculos paravertebrales y se realiza una laminectomía total entre la L1 y la L3, y se realiza la apertura de la duramadre para permitir que el LA entre en contacto con la médula espinal reproduciendo lo que ocurre en fetos humanos. Posteriormente, se cierra la bolsa amniótica, el LA se repone, y se procede al cierre del útero y de la laparotomía por cierre en capas. En la Figura 16 se muestran dos momentos de la cirugía de creación del defecto en el feto ovino (Fontecha, Peiro et al. 2009).

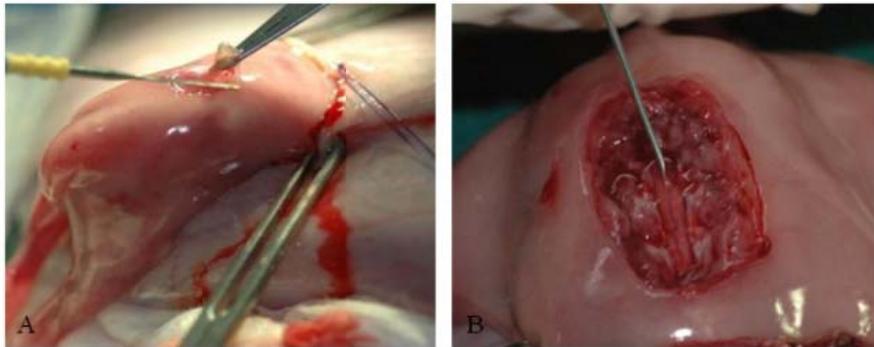


Figura 16- Cirugía de creación del MMC en oveja. Apertura de las estructuras mediante laminectomía (A) y de la duramadre para exposición de la médula espinal (B)

Ya en el año 1995, *Meuli* demostró que el modelo ovino presentaba grandes similitudes con los casos de MMC humanos, debido a que en sus experimentos, los fetos ovinos desarrollaban quistes que contenían tejido neural en su interior, necrosis de la médula espinal y pérdida de tejido neural en las zonas expuestas, al igual que se observa en los casos de MMC humanos (*Meuli, Meuli-Simmen et al. 1995*).

El modelo en oveja de MMC es, actualmente, uno de los más utilizados, dado que tiene un tiempo de gestación suficientemente largo como para poder realizar varias intervenciones en la misma gestación, y, tanto el tamaño como las características del feto ovino son muy similares al feto humano. Sin embargo, por cada oveja gestante se obtiene uno o dos fetos por lo que es necesario un elevado número de ovejas gestantes para el abordaje de los experimentos.

Este modelo de MMC ovino, ha recibido ciertas críticas sobre si se podría extrapolar los resultados al humano debido a que se realiza de manera quirúrgica; la cirugía se realiza en mitad de la gestación ovina y porque además la duración del embarazo es la mitad que en la especie humana. Estas críticas se han contrarrestado con el hecho de que en la intervención se abre la dura madre y la lesión se realice en, como mínimo, tres vértebras de manera muy parecida al defecto en fetos humanos. Otra de las ventajas que tiene este modelo es que el feto ovino es muy similar en cuanto a tamaño y anatomía al feto humano.

### 3.3.5. Modelo de MMC en primates no humanos

Inicialmente, los modelos de MMC creados en primates no humanos se basaban en la administración de algún tipo de corticoesteroide sintético, como por ejemplo el ácido valproico, a la madre gestante. Sin embargo, este tipo de inducciones teratogénicas del MMC iban acompañadas de otros defectos, por lo que no se conseguía tener animales con la espina bífida como defecto aislado (Michejda and McCollough 1987).

Por ello, comenzaron a realizarse modelos quirúrgicos de MMC en primates, de manera que entre los días 110 y 125 de gestación se realizaba una laparotomía a la madre y se exponía la zona lumbar del feto, al cual se le realizaba la escisión de tres vertebras (L3, L4 y L5) y se dejaba la médula expuesta (Figura 17) consiguiendo así, evaluar el efecto tóxico del LA sobre el tejido medular cuando se realizaba la cesárea del feto al finalizar la gestación, entre los días 160 y 165 de gestación (Michejda 1984; Galvan-Montano, Cardenas-Lailson et al. 2007).

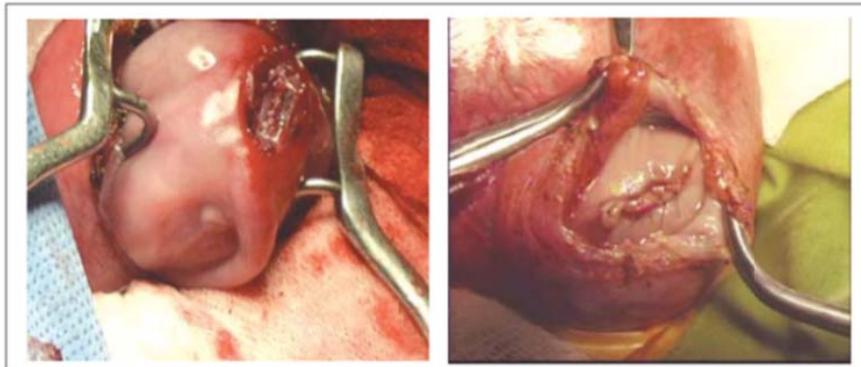


Figura 17- Modelo de MMC en Macaca Mulatta. Fuente: (Galvan-Montano, Cardenas-Lailson et al. 2007)

El modelo en primate de MMC representa un modelo experimental poco económico, debido a que los animales tienen un elevado coste y cada primate gestante presenta normalmente un único feto. Los problemas éticos que acompañan a la utilización de primates no humanos son muchísimos y se necesitan permisos e instalaciones especiales para el desarrollo de experimentos con ellos. Por otro lado, el tiempo de gestación de un primate es de más de cinco meses lo que ralentiza la evaluación de los resultados.

En cambio, su similitud al feto humano y el elevado tiempo de gestación son ventajas, dado que permite imitar fielmente al modelo de lesión detectada en la clínica humana y permite hacer varias intervenciones con un tiempo adecuado de recuperación entre las mismas, por lo que se pueden plantear experimentos de creación del defecto de forma quirúrgica y semanas después, abordar la intervención para la reparación del defecto lumbar mediante diferentes aproximaciones terapéuticas.

## **Hipótesis de trabajo**



Uno de los daños neurales que el feto afecto de MMC sufre durante su desarrollo es la progresiva pérdida de LCF a través del defecto en el cierre de la zona lumbar, de esta manera las células del líquido cefalorraquídeo se mezclan con las células del líquido amniótico.

Como ya se ha citado anteriormente, el LCF podría contener células madre o progenitoras neurales con capacidad de diferenciación hacia los tres linajes neurales (neuronal, astrocitario y oligodendrocitario). Dado que en los pacientes con MMC podemos encontrar dos situaciones diferentes, por un lado fetos con saco quístico sobre el defecto congénito (el cual contiene LCF), o bien casos de fetos con MMC abierto donde se produce la progresiva pérdida de LCF hacia la cavidad amniótica, la presencia de células progenitoras neurales se presentaría bien el LCF contenido en el quiste lumbar o bien en el líquido amniótico en los casos de espina bífida abierta.

En caso de poder identificar y aislar células progenitoras neurales a partir de muestras de LCF o de LA de pacientes con MMC, y proceder a su expansión en cultivo primario, éstas células podrían ser las candidatas idóneas para su utilización en nuevas estrategias terapéuticas basadas en terapia celular autóloga dirigida a promover la regeneración del tejido neural dañado en la médula espinal de fetos con MMC.

Por ello, planteada esta situación, nuestra hipótesis de trabajo se basa en la posible existencia de una población de células progenitoras neurales en el LCF de fetos humanos, las cuales podrían ser aisladas a partir de muestras de LCF o LA de pacientes con MMC y que podrían ser utilizadas para el trasplante celular en la zona lesionada de la médula espinal. El ensayo de la terapia celular en modelos animales de espina bífida, con el fin de evaluar su implantación y posterior estimulación de la regeneración neural del tejido medular dañado, podría generar nuevas estrategias terapéuticas futuras en la clínica humana.



# Objetivos



El objetivo general del presente trabajo es el estudio y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas con el fin de promover la regeneración neural de la médula espinal en fetos que presentan la patología de la espina bífida, mediante la obtención y trasplante de células progenitoras neurales obtenidas a partir de muestras de pacientes con MMC.

De esta manera, para el desarrollo de la presente tesis nos planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

1. Establecimiento de cultivos primarios de células procedentes de muestras de LCF y LA de pacientes con MMC y de modelo ovino de espina bífida:

i. Modelo animal en oveja: Cultivo primario de células a partir de muestras de líquido cefalorraquídeo y líquido amniótico de fetos de ovejas con MMC y fetos sanos.

ii. Muestras humanas: Cultivo primario de células a partir de líquido cefalorraquídeo y líquido amniótico de pacientes con MMC y sanos.

2. Estudio de la presencia y caracterización de células progenitoras neurales en muestras de LCF y LA mediante análisis de la morfología y expresión de marcadores específicos por inmunocitofluorescencia (ICF), western-blot y RT-PCR.

3. Ensayos *in vitro* de la capacidad de diferenciación de progenitores neurales hacia células de linaje neural utilizando distintos protocolos de diferenciación específica (neurona, astrocitos y oligodendrocitos). Análisis de la capacidad de diferenciación neural mediante ICF.

4. Análisis de la colonización y viabilidad de células progenitoras neurales en *scaffolds* biocompatibles como paso previo a su utilización en trasplante celular *in vivo*.

5. Desarrollo de un nuevo modelo de lesión de MMC en fetos de conejo sobre el que se realizarán los primeros estudios *in vivo* para el ensayo del trasplante celular con progenitores neurales en *scaffolds* biocompatibles, como paso previo al trasplante celular en el modelo ovino de MMC. Análisis de la implantación de células progenitoras neurales en médula espinal del modelo de conejo con MMC.

6. Ensayos de terapia celular en modelo experimental de MMC en oveja, basados en el trasplante de progenitores neurales obtenidos de LA del propio individuo para reparación de la lesión medular derivada del MMC.

## **Materiales y métodos**



## **1. Obtención de muestras de LA y LCF**

### **1.1. Muestras de LA**

#### **1.1.1. Origen ovino**

Todos los procedimientos que se realizaron en el modelo experimental de oveja fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal (nº CEEA 20/10) del Instituto de Investigación del Hospital Universitario Vall d' Hebrón.

El líquido amniótico (LA) de origen ovino se recogió en cada una de las intervenciones prenatales llevadas a cabo en ovejas gestantes. De esta manera, a los 75 días de gestación, en el momento previo a la cirugía de creación quirúrgica del defecto del MMC, se recogieron unos 20ml de LA que fue clasificado como LA sano y que fue utilizado para el establecimiento del cultivo celular.

Veinte días más tarde, a los 95 días de gestación, se realizó una segunda intervención a la oveja gestante, en la que se reparó la lesión del MMC creada en la cirugía anterior. También en esta cirugía, en el momento previo a la

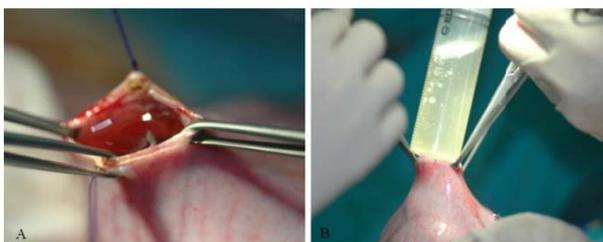


Figura 18- Recogida de LA del útero ovino

intervención quirúrgica de reparación del defecto, se recogieron unos 20ml de LA procesado como LA MMC y que fue utilizado para el establecimiento del cultivo celular primario (Figura 18).

#### **1.1.2. Origen humano**

Todas las pacientes de las que se obtuvo LA fueron detalladamente informadas del procedimiento y firmaron un consentimiento informado de cesión de material para el protocolo experimental, el cuál fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Vall d' Hebrón (ID: PR (AMI) 65/2013).

Las muestras de líquido amniótico correspondientes a fetos afectados por MMC se obtuvieron a partir de una amniocentesis previa a la cirugía de reparación del MMC o bien durante la cirugía fetal reparadora del defecto entre las semanas 19 y 25 de gestación. Todas las muestras de LA se obtuvieron tras haber confirmado la presencia del defecto de MMC mediante ecografía o RMN (Figura 19).

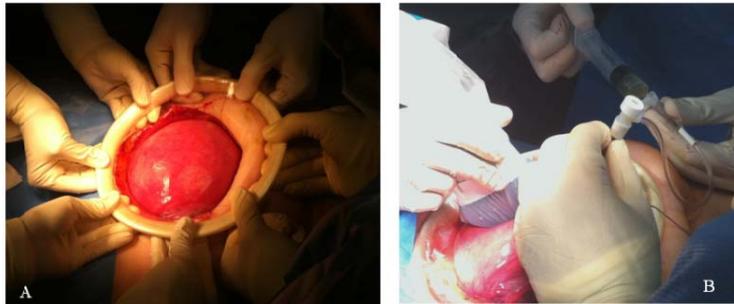


Figura 19- Externalización del útero en una cirugía reparadora de MMC (A) y recogida de LA (B).

Las muestras de LA sano se obtuvieron de LA sobrante utilizado para las amniocentesis de rutina en el servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Vall d'Hebrón. Todas las muestras de LA denominado como sano corresponden a muestras de LA de fetos que no presentaron ningún defecto de tubo neural.

En todos los casos, se obtuvieron de cada paciente entre 15 y 20ml de LA que fueron inmediatamente utilizados para establecer el cultivo celular primario.

## **1.2. Muestras de LCF**

### **1.2.1. Obtención de muestras de LCF de origen ovino**

Las muestras de LCF ovino que se utilizaron en el presente trabajo se obtuvieron en el momento de la primera cirugía de creación del defecto de MMC. El LCF se obtuvo mediante aspiración de líquido del canal medular tras la cirugía de creación del MMC, procedimiento que se detalla en el apartado 10 de esta misma sección que consiste en la resección de la piel y músculos paravertebrales de la región lumbar del feto, laminectomía de las vértebras lumbares y la apertura de la membrana duramadre y exposición de la médula

espinal. Las muestras de LCF obtenidas fueron de un volumen aproximado de 2ml, los cuáles se utilizaron inmediatamente después de su obtención para el establecimiento de cultivo celular primario. En la Figura 20 se ilustra el tipo de punción realizada en el feto ovino para obtención de LCF.

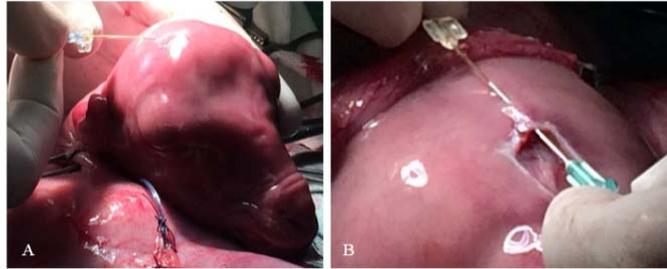


Figura 20- Obtención del LCF en la oveja a partir de la cisterna magna (A) o del canal medular (B)

### 1.2.2. Obtención de muestras de LCF de origen humano

Las muestras de LCF de origen humano se obtuvieron a partir de fetos afectados de MMC con quiste. En estos pacientes, el LCF se acumula en el quiste que recubre la zona del defecto del MMC y se puede recolectar fácilmente durante la cirugía de reparación quirúrgica del MMC. En estos casos, una vez expuesta la región lumbar del feto durante la intervención quirúrgica, el LCF se obtuvo por punción del quiste y aspiración del LCF que contenía.

Las muestras obtenidas a partir de quistes de pacientes con MMC oscilaron entre 1.5-2.5 ml y fueron utilizadas para el establecimiento de cultivos celulares inmediatamente tras su recolección. En la Figura 21 se ilustra el quiste que recubre el defecto del MMC en fetos humanos.

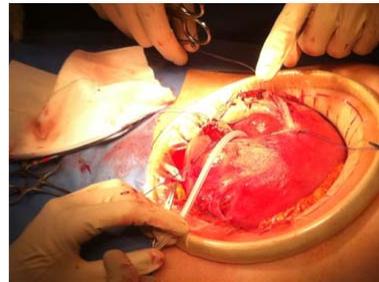


Figura 21- MMC cístico de donde se obtiene el LCF humano durante la intervención quirúrgica de reparación del defecto

## **2. Cultivo celular de LA y LCF**

### **2.1. Establecimiento del control positivo**

Con el fin de obtener una población de células madre neurales que nos sirviese como control positivo para comparar con las células con propiedades de progenitores neurales obtenidas del LCF o del LA, decidimos establecer un cultivo primario de NSCs (*Neural Stem Cells*) a partir de muestras de médula espinal de fetos humanos y de oveja. Para ello, nos basamos en un protocolo utilizado en médula espinal de rata y descrito con anterioridad (Reynolds and Weiss 1992; Fauza, Jennings et al. 2008; Mothe and Tator 2013; Jin, Bouyer et al. 2016), el cual fue necesario optimizar para la obtención y cultivo de neuroesferas de origen humano y ovino que nos permitiese después comparar con las células que se lograsen aislar de las muestras de LA y LCF procedentes de fetos con MMC.

Las neuroesferas se obtuvieron a partir del tejido de médula espinal de cordero o de fetos humanos obtenidos de necropsias tras interrupción legal del embarazo y con aprobación del Comité de Ética del Hospital Vall d'Hebrón (PR (AMI) 65/2013). En ambos caso se recogió el tejido fresco y se diseccionó mecánicamente con una hoja de bisturí en PBS w/o  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  (Biowest, L0615) en condiciones de esterilidad.

Una vez la médula quedó suficientemente diseccionada se centrifugó a 1000rpm durante 5 minutos y el *pellet* se resuspendió con una solución de tripsina al 0,25% (Biowest, L0910-100) y se sembró en placa de cultivo (Labclinics, PLC-20060) pretratada con fibronectina (PromoCell, C-43050) donde el tejido medular diseccionado se incubó con tripsina durante 15 minutos a 37°C en un incubador en ambiente de  $\text{CO}_2$  al 5%.

Tras la incubación con tripsina se añadió medio 1 [DMEM *high glucose with glutamine and sodium pyruvate* (Biowest- L0104-500) + 10% FBS (Gibco, 10270-106) + penicilina/estreptomicina (Biowest, L-0010)] y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. El *pellet* resultante se resuspendió de nuevo con medio 1 y se sembró en la misma placa tratada utilizada anteriormente durante 1 hora. Posteriormente, se recogió el medio con las células en suspensión y se pasó por un filtro de 100 $\mu\text{m}$  (Labclinics, PLC93100) Una vez filtrada, la suspensión celular se centrifugó a 1000rpm durante 5min y el *pellet* se resuspendió en medio Neurobasal (Gibco, 21103-049) suplementado con B27 (Gibco, 17504-044) para plaquearlo definitivamente en una placa de cultivo específica para cultivos de

células en suspensión (Cultek, 153261). El cultivo se expandió durante un máximo de 10 días en medio neurobasal en un incubador a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

## **2.2. Cultivo primario de LCF**

Tras la recogida de las muestras de LCF, se inició el cultivo celular inmediatamente en condiciones de esterilidad. Las muestras obtenidas de LCF, las cuales normalmente fueron de unos 1,5-2ml, se mezclaron con 15ml de medio de proliferación, consistente en *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Biowest, L-0104-500), medio M-199 (Biowest, L-0355-500) en proporción 3:1, suplementado con 10% FBS (Gibco, 10270-106) , 2mM glutamina (Gibco, 25030081), 25ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico (FGF2) (MiltenyBiotec, 130-093-837), 10ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (MiltenyBiotec, 130-093-825) y antibiótico/antimicótico (Biowest, L-0010) y se sembraron en un flascón de cultivo de 75cm<sup>2</sup> (Nunc, 156499).

Tras 10-15 días en cultivo celular a 37°C, 95% de humedad y CO<sub>2</sub> al 5%, comenzaron a aparecer las primeras colonias de células adherentes y fue entonces cuando se realizó el primer cambio de medio, eliminando también las células no adherentes y el debris celular. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 40-50%, se tripsinizaron y se sembraron sobre cubreobjetos circulares de 200 mm de diámetro (Marienfeld, 0111600), previamente colocados en placas de cultivo de 12 pocillos (Sardsted, 83.3921), a razón de 25.000 células/pocillo, para realizar los análisis mediante inmunocitofluorescencia y caracterización de las NPCs. Además de estas placas multipocillos también se sembraron dos placas de 60mm (Nunc, 150350), a razón de 100.000 células/placa, para proceder a su expansión y una vez alcanzada una confluencia del 50-60% proceder a la extracción de RNA de las células en cultivo para los posteriores análisis de expresión génica mediante RTqPCR y para el análisis de expresión de proteínas específicas mediante western-blot.

Las células sobrantes se congelaron tras tripsinización y resuspensión en medio de congelación, compuesto por DMEM *high glucose with glutamine and sodium piruvate* (Biowest L0104-500), 10% de FBS (Gibco, 10270-106), 8% DMSO (Sigma Aldrich, D450) y antibiótico/antimicótico 1x (Biowest, L0010). Tras la resuspensión, el medio con células se depositó en Criotubos Nalgene® (VWR, 479-3222) y se procedió a la congelación progresiva hasta -80°C durante 16 h utilizando un contenedor de congelación *Mr. Frosty* de Nalgene® (Thermo

Fisher, 5100-0001) para posteriormente ser almacenadas en contenedores de nitrógeno líquido y crioconservarlas para posibles usos posteriores.

### **2.3. Cultivo primario de LA**

Las muestras de LA obtenidas se utilizaron para el establecimiento del cultivo celular inmediatamente tras su obtención. Para ello, 10 ml del LA obtenido se mezclaron con 15 ml de medio de proliferación [compuesto de DMEM *high glucose with glutamine and sodium piruvate* (Biowest- L0104-500) y MEM-199 (Biowest, L-355-500) en proporción 3:1, suplementado con 10% FBS (Gibco, 10270-106), antibiótico/antimicótico 1x (Biowest, L0010), 25 ng/ml FGF2 (MiltenyBiotec, 130.093.564) y 10 ng/ml EGF (MiltenyBiotec, 103-093-825)], se sembraron en un flascón de cultivo de 75cm<sup>2</sup> (Nunc, 156499) y se incubó durante 10-15 días en un incubador de cultivo celular a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% y humedad del 95% hasta que comenzaron a aparecer las primeras colonias celulares.

Una vez aparecieron las colonias celulares, se procedió a su tripsinización y homogeneización del cultivo celular, utilizando tripsina al 0.25% (Biowest, L0910-100), y a su pase celular. Una vez se alcanzó una confluencia del 40-50%, se tripsinizaron y se sembraron sobre cubreobjetos circulares de 200 mm de diámetro (Marienfeld, 0111600), previamente colocados en placas de cultivo de 12 pocillos (Sardsted, 83.3921), a razón de 25.000 células/pocillo, para realizar los análisis mediante inmunocitofluorescencia y localización de las NPCs. Además de estas placas multipocillos también se sembraron dos placas de 60mm (Nunc, 150350), a razón de 100.000 células/placa, para proceder a su expansión y una vez alcanzada una confluencia del 50-60% proceder a la extracción de RNA de las células en cultivo para los posteriores análisis de expresión génica mediante RTqPCR y para el análisis de expresión de proteínas específicas mediante western-blot.

Las células sobrantes se congelaron tras la tripsinización y resuspensión en medio de congelación, compuesto por DMEM *high glucose with glutamine and sodium piruvate* (Biowest L0104-500), 10% de FBS (Gibco, 10270-106), 8% DMSO (Sigma Aldrich, D450) y antibiótico/antimicótico 1x (Biowest, L0010). Tras la resuspensión, el medio con células se depositó en Criotubos Nalgene® (VWR, 479-3222) y se procedió a la congelación progresiva hasta -80°C durante 16 h utilizando un contenedor de congelación *Mr. Frosty* de Nalgene® (Thermo Fisher, 5100-0001), para posteriormente ser almacenadas en contenedores de nitrógeno líquido y crioconservarlas para posibles usos posteriores

## 2.4. Optimización de las condiciones de cultivo

Para poder establecer las condiciones de cultivo óptimas de las células de LCF y de LAs se realizaron diferentes pruebas variando distintos factores: crecimiento celular sobre diferentes matrices, diversos medios de cultivo de proliferación y varios factores de crecimiento añadidos. En la Tabla 3 se muestra un resumen de las diversas condiciones ensayadas.

Para cada uno de los medios de cultivo utilizados en el estudio de proliferación celular, se utilizaron diferentes matrices sobre las que se sembraron las células, tal y como se indica en cada uno de los protocolos existentes en la literatura:

Matrices	Medios de proliferación	Factores de crecimiento
Cellstart	Medio CP	FGF
Laminina	Medio NK	EGF
Poly-D-lysine	Medio SP	NGF
Poly-L-lysine	Medio UNIM1	BDNF
Matrigel	Medio UNIM2	RA
Collagen	Medio SL	
Fibronectina		
Geltrex		
W/o matriz		

Tabla 3- Relación de productos probados para la establecer las condiciones óptimas de proliferación celular.

- Las placas tratadas con *cellstart* (Gibco, A10142-01) se incubaron con una dilución 1:50 en PBS+ Ca<sup>+2</sup> + Mg<sup>+2</sup> (Gibco, 14040-174) durante 2 horas a 37°C, tras lo cual se aspiró la solución de *cellstart* justo antes de sembrar las células.

- La laminina (Millipore, CC095) se utilizó a 10µg/ml y las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C. Antes de sembrar las células las placas tratadas se lavaron con PBS w/o Ca<sup>+2</sup> ni Mg<sup>+2</sup> (Biowest, L0615-500).
- La poly-D-lysina (Millipore, A-003-E) se utilizó a 100µg/ml, las placas se incubaron 3 horas a temperatura ambiente y antes de sembrar las células las placas se lavaron con agua destilada estéril.
- La poly-L-lysina (Sigma, P4707) se utilizó al 0.01% (w/v), las placas fueron incubadas 5 minutos con la solución de poly-L-lysina y no fue necesario lavarlas antes de sembrar las células, sólo aspirar la solución de poly-L-lysina.
- El matrigel utilizado (BD, 356234) se usó a 1mg/ml en medio DMEM con antibiótico, después de dejar actuar 5 minutos el matrigel sobre la placa de cultivo, ésta se secó durante 3 horas en el incubador antes de sembrar las células.
- La matriz de colágeno (BD, 354265) utilizada se diluyó hasta una concentración de 50µg/ml en ácido acético (Sigma, 320099) al 0,02M, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y, antes de sembrar las células, la placa se lavó con PBS estéril sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> (Biowest, L0615-500).
- Las placas tratadas con fibronectina (Promocell, 43060) se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una dilución de fibronectina a 10µg/ml en PBS sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> (Biowest, L0615-500). Tras la incubación se aspiró el exceso de solución de fibronectina y sin la necesidad de un lavado previo, se sembraron las células.
- Para la incubación con geltrex (Gibco, A1413201), las placas se cubrieron con la solución comercial y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Antes de sembrar las células se lavaron las placas de cultivo con PBS con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (Gibco, 14040091).

Otro de los puntos a optimizar en el crecimiento del cultivo primario, además de la matriz sobre la que crecen las células, es el medio de cultivo utilizado para promover la proliferación celular, por ello se realizaron pruebas utilizando diferentes medios de cultivo:

- Medio CP: Relación 3:1 de *DMEM high glucose with glutamine and sodium piruvate* (Biowest- L0104-500) y MEM 199 (Biowest, L-355-500), 10% FBS (Gibco, 10270-106), solución antibiótico/antimicótico 1x (Biowest, L0010).
- Medio NK: DMEM-F12 (Gibco, 31331-028), suplementado con B27 (Gibco, 17504044), N2 (Gibco, 17502-048), 2µg/ml de heparina (Sigma, H3149), 1µg/ml de laminina (Sigma, L2020).
- Medio SP: StemPro® NSC SFM (Life Technologies, A1050901) suplementado con GlutaMAX (LifeTechnologies, 35050061), 20ng/ml de FGF (MiltenyBiotec, 130.093.564), 20ng/ml de EGF (MiltenyBiotec, 103.093.825) y antibiótico/antimicótico 1x (Biowest, L0010).
- Medio UNIM1: DMEM-F12 (Gibco, 31331-028), suplementado con glucosa (Sigma, G7528) al 30%, 7.5% NaHCO<sub>3</sub> (Sigma, S5761), hepes 1M (Gibco, 15630-080), L-glutamina (Gibco, 25030-081), 400mg de apo-transferrina (Sigma, T-2252), 100mg de insulina (Sigma, I2643), 38.6mg de putrescina (Sigma, P-7505), 2µM de progesterona (Sigma, P-8783), 3mM de selenito de sodio (Sigma, S-9133), FBS 1% (Gibco, 10270-106), penicilina/estreptomicina 1x (Biowest, L0010).
- Medio UNIM 2: DMEM-F12 (Gibco, 31331-028), suplementado con glucosa al 30%, NaHCO<sub>3</sub> (Sigma, S5761), hepes 1M (Gibco, 15630-080), L-glutamina (Gibco, 25030-081), 400mg de apo-transferrina (Sigma, T-2252), 100mg de insulina (Sigma, I2643), 38.6mg de putrescina (Sigma, P-7505), 2µM de progesterona (Sigma, P-8783), 3mM de sodio-selenito (Sigma, S-9133), FBS 2% (Gibco, 10270-106), 20ng/ml de BDNF (MiltenyBiotec, 130-096-285), heparina al 0,2% (Sigma, 9041-08-1), 10ng/ml de FGF (MiltenyBiotec, 130.093.564) y penicilina/estreptomicina 1x (Biowest, L0010).

Se probaron diferentes factores de crecimiento que suplementasen al medio con el fin de encontrar las condiciones óptimas de cultivo de las células: FGF2 (MiltenyBiotec, 130.093.564), EGF (MiltenyBiotec, 103.093.825), NGF-β (MiltenyBiotec, 130.093.971), BDNF (MiltenyBiotec, 130.093.811) y ácido retinoico (RA) (Sigma, R2625). Se realizó una batería de pruebas de diferentes concentraciones con cada uno de los distintos medios, estas concentraciones fueron: 1, 2.5, 5, 10 y 20 ng/ml.

Con estos experimentos se pudo determinar cuáles eran las condiciones de cultivo respecto al medio, matriz y factores de crecimiento más favorables para una óptima proliferación de las células del LCF y LA.

## **2.5. Estudios de proliferación celular**

Tras evaluar cómo determinadas combinaciones de matrices, medios y factores de crecimiento favorecían la proliferación de las células procedentes de LCF y LA se realizaron ensayos de velocidad de crecimiento entre las condiciones óptimas. En estos experimentos se sembraron inicialmente 75000 células/pocillo (t0) de LCF y de LAs de diferentes pacientes en las distintas condiciones. Las células se sembraron por triplicado en pocillos de placas de 12 pocillos y dos y cuatro días más tarde de la siembra inicial se contaron las células de los diferentes pocillos utilizando una cámara de Neubauer (Brand, 10360141), para poder establecer la velocidad de proliferación de las células del líquido cefalorraquídeo y del líquido amniótico en función del medio, matriz y concentraciones de factores de crecimiento en los que estaban sembrados.

## **2.6. Aislamiento de clones**

Con el fin de poder aislar los distintos clones celulares de los que estaba compuesto el LA y con la idea de poder identificar cuál de ellos era el que se caracterizaba por sus propiedades de progenitor neural, se utilizaron 2 métodos diferentes para la obtención de diferentes clones celulares. Por un lado, se utilizó el aislamiento de clones celulares por dilución, de manera que 5ml de LA de cada individuo, control o paciente con MMC, fueron previamente diluidos en medio de proliferación [Relación 3:1 de DMEM *high glucose with glutamine and sodium piruvate* (Biowest- L0104-500) y MEM-199 (Biowest, L-355-500), 10% FBS (Gibco, 10270-106), solución antibiótico/antimicótico 1x (Biowest, L0010)] hasta un volumen final de 50ml, tras lo cual se sembró 1ml/pocillo en 4 placas de 12 pocillos y se incubaron en condiciones de 37°C, 95% de humedad y 5% de tensión de CO<sub>2</sub>. Por otro lado, otros 5ml de LA se resuspendieron en 15ml de medio de proliferación y se cultivaron en un flascón de 75cm<sup>2</sup>. El cultivo se fue controlando a diario mediante microscopia óptica para determinar el momento de aparición de las diferentes colonias celulares, momento en el que se aislaron manualmente por raspado de una muestra de células de la colonia, suspendidas en 1 ml de medio de proliferación y sembrado en un pocillo de una placa de 12 pocillos para su expansión en cultivo celular.

En el caso de los clones obtenidos por dilución, se controló a diario mediante microscopia óptica el crecimiento de las colonias para determinar el momento de aparición y comprobar que el cultivo se inició a partir de una única célula. Los pocillos donde se encontró más de una célula fueron descartados para asegurar que siempre se obtenía un único tipo celular en cada uno de los

diferentes pocillos. Estos clones se fotografiaron con un microscopio óptico (Olympus, Bx-61) y se expandieron hasta alcanzar el primer o segundo pase cuando se criopreservaron en medio de congelación [DMEM *high glucose with glutamine and sodium piruvate* (Biowest L0104-500), 10% de FBS (Gibco, 10270-106), 8% DMSO (Sigma Aldrich, D450) y antibiótico/antimicótico 1x (Biowest, L0010)] y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Por otro lado, al LA cultivado en flascón se le fue controlando su crecimiento hasta observar que aparecían diferentes colonias celulares, por lo que utilizando una pipeta *Pasteur* de vidrio estéril (VWR, 612-1702) se aisló cada uno de los distintos clones mediante raspado de la colonia celular y se expandió su cultivo con medio de proliferación [Relación 3:1 de DMEM *high glucose with glutamine and sodium piruvate* (Biowest- L0104-500) y MEM 199 (Biowest, L-355-500), 10% FBS (Gibco, 10270-106), solución antibiótico/antimicótico (Biowest, L0010)] hasta el pase 1 ó 2 cuando se congelaron las células y se criopreservaron en nitrógeno líquido. La Figura 22 ilustra ambos métodos utilizados para el aislamiento de clones.

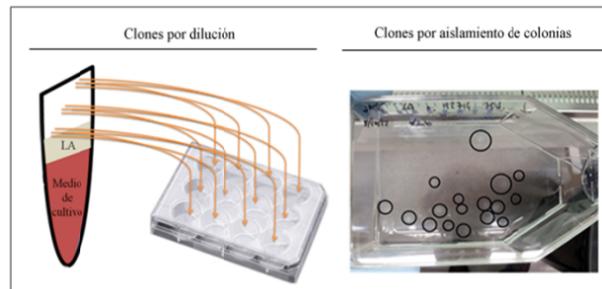


Figura 22- Diferentes métodos para el aislamiento de clones

### 3. Purificación celular

Una vez confirmada la presencia de células positivas para el marcador CD15, el cuál es una proteína transmembrana que marca específicamente a las células con características de NPCs, se procedió al enriquecimiento en NPCs de los cultivos de LAs obtenidos de los pacientes con MMC abierto, los LAs de pacientes que presentaban MMC quístico no se utilizaron para aislar NPCs dado que la migración de células con características de progenitores neurales desde el LCF al LA es mínima o, incluso inexistente.

Así, partiendo de los cultivos primarios de LAs se llevaron a cabo ensayos de purificación y enriquecimiento en progenitores neurales en base a la presencia de la proteína de superficie CD15, marcador específico de progenitores neurales, utilizando el kit comercial MACS® *MicroBeads* (MiltenyBiotec) de columnas de afinidad inmunomagnética, tal y como se muestra en el esquema de la Figura 23. Este kit comercial consiste en unas microesferas magnéticas unidas al anticuerpo específico que reconoce la proteína de interés en función de la que se quiere realizar la separación.

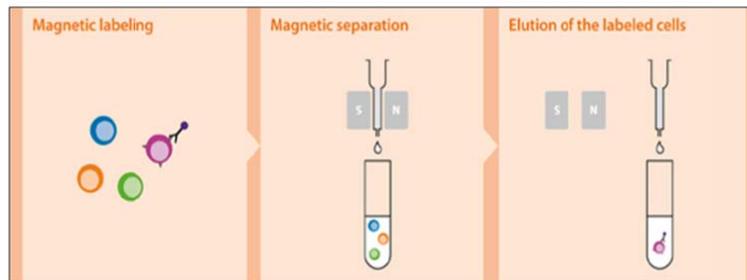


Figura 23- Esquema de la separación inmunomagnética

Las *MicroBeads* que se utilizaron fueron las específicas para separar en función de la presencia de la proteína de membrana CD15 (Milteny Biotec, 130-046-601) y se utilizó el kit de purificación magnética *Mini MACS Starting Kit* (130-090-312) compuesto por las *MACS MS Columns* (130-042-201) y el *Mini MACS Separator* (130-042-102). La purificación celular se llevó a cabo siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. Brevemente, se preparó el *buffer* de PBS + BSA al 0.5% (Sigma, A3059) y EDTA 2mM (Sigma, 1233508) que se tuvo que mantener siempre frío por lo que todo el proceso se realizó en hielo. Las células que se sometieron a la separación inmunomagnética se tripsinizaron y se contaron con la ayuda de la cámara de *Neubauer* (Brand, 10360141) y se centrifugaron durante 10 min a 300g, el sobrenadante se descartó completamente. Posteriormente, el *pellet* celular se resuspendió en 300µL del *buffer* preparado anteriormente y se añadieron 100µL de *FcR blocking reagent* y 100µL de las *Microbeads* magnéticas específicas para la proteína CD15 y se dejaron incubar durante 30min a 4°C. Pasado este tiempo las células se lavaron con 2ml de *buffer* y se centrifugaron a 300g durante 10 min. El *pellet* se resuspendió en 500µL de *buffer* y la suspensión se introdujo en la columna colocada en el imán unido al MACS separador. La solución celular se dejó circular a través de la columna por gravedad y se fue recogiendo la fracción CD15

negativa en un tubo de 50ml (Labbox, 16535), la columna se lavó 3 veces con 500 $\mu$ L de *buffer* cada vez. La fracción CD15 (+) se obtuvo tras retirar la columna del separador magnético y añadir 1ml de *buffer* para facilitar la elución de la fracción celular CD15 positiva que se recogió en un *Eppendorf* (Sorenson, 37840). Al final del proceso, ambas fracciones resultantes se contaron y se cultivaron en placas separadas con medio de proliferación celular [Relación 3:1 de DMEM *high glucose with glutamine and sodium piruvate* (Biowest- L0104-500) y MEM 199 (Biowest, L-355-500), 10% FBS (Gibco, 10270-106), solución antibiótico/antimicótico (Biowest, L0010)].

Una vez las poblaciones celulares CD15 (+) y CD15 (-) se expandieron en cultivo por separado hasta una confluencia del 40-50%, se sembraron las células sobre cubreobjetos de 20mm (VWR, 631-0670) colocados en placas de 12 pocillos con el fin de evaluar la expresión de los marcadores específicos de NPCs, TBR2, Sox2 y CD15, mediante inmunocitofluorescencia. Así, una vez realizada la inmunocitofluorescencia, siguiendo el protocolo que se detalla más adelante, se analizaron 6 campos fotografiados al azar de tres cubreobjetos diferentes (hasta el conteo de un número aproximado de 250 células) y se realizaron los recuentos de las células positivas para los anticuerpos TBR2, Sox2 y CD15 para expresar el resultado en porcentaje. Mediante este conteo se pudo determinar la eficiencia de la purificación de células con la que se consiguió enriquecer la población de NPCs en los cultivos celulares procedentes de LAs de pacientes con MMC.

Además, la población enriquecida para células CD15 positivas, se expandió en cultivo y se realizaron ensayos de diferenciación mediante distintos protocolos específicos a oligodendrocitos, neuronas y astrocitos. De estas NPCs diferenciadas también se realizaron análisis de ICF para distintos marcadores: CD15 y TBR2 como marcadores de NPCs y también marcadores específicos de diferenciación de linaje neural,  $\beta$ III-tubulina como marcador de neurona, CNPase como marcador de oligodendrocito y GFAP para marcaje de astrocitos.

#### **4. Ensayos de diferenciación celular**

Con el fin de evaluar las características de precursores neurales y su capacidad de diferenciarse a células del linaje neural, como neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, las células obtenidas en cultivo primario a partir de muestras de LCF y de LA se sometieron a distintos protocolos de diferenciación que se detallan a continuación:

#### **4.1. Diferenciación arbitraria**

Las células (100.000 células/pocillo) se sembraron sobre cubreobjetos de 20mm (VWR, 631-0670) en placas de cultivo de 12 pocillos y se cultivaron con medio de proliferación [Relación 3:1 de DMEM *high glucose with glutamine and sodium piruvate* (Biowest- L0104-500) y MEM-199 (Biowest, L-355-500), 10% FBS (Gibco, 10270-106), solución antibiótico/antimicótico (Biowest, L0010)] hasta alcanzar una confluencia del 50%. Las células se lavaron con PBS (Biowest, L0615- 500) y después se incubaron con medio de cultivo *StemPro® NSC SFM* (Life Technologies, A1050901) durante 12 días para inducir la diferenciación arbitraria de los diferentes subtipos de células del linaje neural. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días y, al cabo de 12 días de diferenciación, las células se lavaron con PBS estéril (Biowest, L0615- 500) y se fijaron con PFA (Aname, 157-4-100) al 4% para su utilización en ensayos de inmunocitofluorescencia y determinación de marcadores neurales específicos.

#### **4.2. Diferenciación específica hacia linaje neuronal**

Para inducir la diferenciación celular específica hacia linaje neuronal, las células se sembraron sobre cubreobjetos (VWR, 631-0670) en placas de cultivo de 12 pocillos y se incubaron con un medio de diferenciación específico. Los cubreobjetos se pre-trataron con 20 µg/ml de poly-L- ornithina (P3655, Sigma) durante 1 hora a 37°C y tras un lavado con agua destilada se incubaron con una solución de 10µg/ml de laminina (Merck Millipore, CC095) durante 2 horas a 37°C y se lavaron con PBS estéril sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> (Biowest, L0615-500). Las células (100.000 células/pocillo) se incubaron con medio de proliferación (3:1 de DMEM *high glucose with glutamine and sodium piruvate* (Biowest- L0104-500) y MEM 199 (Biowest, L-355-500) suplementado con 10% FBS (Gibco, 10270-106), 2mM glutamina (Gibco, 25030081), 25ng/ml de FGF2 (MiltenyBiotec, 130.093.564), 10ng/ml de EGF (MiltenyBiotec, 103-093-825) y antibiótico/antimicótico 1x (Biowest, L0010)) hasta que alcanzaron una confluencia del 50%. Entonces, se lavaron con PBS estéril (Biowest, L0615- 500) y se incubaron durante 7 días con el medio específico de diferenciación a linaje neural, compuesto por: medio Neurobasal (Life Technologies, 21103-049), 2% de suplemento B-27 (Life Technologies, 17504-044), 2mM GlutaMAX (Life Technologies, 35050-061) y antibiótico/antimicótico (Biowest, L0010). Tras los primeros 7 días se añadió dibutilil-cAMP (Sigma, D0627) a 0,5mM durante tres días más para inducir la diferenciación final de las neuronas. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días. Al final del proceso de diferenciación las células se lavaron con PBS estéril (Biowest, L0615- 500) y se fijaron con PFA (Aname, 157-

4-100) al 4% para su utilización en ensayos de inmunocitofluorescencia y determinación de marcadores neurales específicos.

### **4.3. Diferenciación específica hacia linaje astrocitario**

Para estimular la diferenciación celular específica hacia linaje astrocitario, las células (100.000 células/pocillo) se sembraron sobre cubreobjetos (VWR, 631-0670) en placas de cultivo de 12 pocillos pre-tratados con una dilución 1:200 de Geltrex™ Matrix (Thermo Fisher Scientific, 12760) en DMEM/F-12 (Life Technologies, 31331028) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el pre-tratamiento, los cubreobjetos se lavaron con PBS con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Gibco, 14040091) y se sembraron las células en medio de proliferación (medio 3:1 de DMEM *high glucose with glutamine and sodium pyruvate* (Biowest- L0104-500) y MEM 199 (Biowest, L-355-500) suplementado con 10% FBS (Gibco, 10270-106), 2mM glutamina (Gibco, 25030081), 25ng/ml de FGF2 (MiltenyBiotec, 130.093.564), 10ng/ml de EGF (MiltenyBiotec, 103-093-825) y antibiótico/antimicótico (Biowest, L0010)) hasta alcanzar una confluencia del 50% y empezar el proceso de diferenciación. Tras un lavado con PBS estéril (Biowest, L0615- 500) se incubaron las células durante 10 días con medio de cultivo de diferenciación astrocitaria, compuesto por: DMEM (Biowest, L0104-500) con 1% de N2 (Gibco, 17502048), 2mM GlutaMAX-1 (Life Technologies, 35050-061), 1% FBS (Gibco, 10270-106) y solución antibiótico/antimicótico (Biowest, L0010). El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días. Al final del proceso de diferenciación las células se lavaron con PBS estéril (Biowest, L0615-500) y se fijaron con PFA (Aname, 157-4-100) al 4% para su utilización en ensayos de inmunocitofluorescencia y determinación de marcadores neurales específicos.

### **4.4. Diferenciación específica hacia linaje oligodendrocitario**

La diferenciación celular específica hacia oligodendrocitos se llevó a cabo sobre cubreobjetos colocados en placas de cultivo de 12 pocillos y pre-tratados con 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de poly-L- ornithina (Sigma, P3655) y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de laminina (Merck Millipore, CC095), en las mismas condiciones que las indicadas en el apartado 4.2, sobre los que se sembraron las células (100.000 células/pocillo) en medio de proliferación [3:1 de DMEM *high glucose with glutamine and sodium pyruvate* (Biowest- L0104-500) y MEM 199 (Biowest, L-355-500) suplementado con 10% FBS (Gibco, 10270-106), 2mM glutamina (Gibco, 25030081), 25ng/ml

de FGF2 (MiltenyBiotec, 130.093.564), 10ng/ml de EGF (MiltenyBiotec, 103-093-825) y antibiótico/antimicótico (Biowest, L0010)]. Una vez el cultivo celular alcanzó el 50% de confluencia, se lavó la monocapa con PBS estéril (Biowest, L0615- 500) y se incubaron las células durante 10 días con el medio de diferenciación oligodendrocitaria, compuesto por: Medio Neurobasal (Life Technologies, 21103-049), 2% de B-27(Life Technologies, 17504-044), 2mM GlutaMAX (LifeTechnologies, 35050-061), 30ng/ml Triiodo-L-Thyronina (T6397, Sigma) y solución antibiótica/antimicótica 1x (Biowest, L0010). El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días. Al final del proceso de diferenciación las células se lavaron con PBS estéril (Biowest, L0615- 500) y se fijaron con PFA (Aname, 157-4-100) al 4% para su utilización en ensayos de inmunocitofluorescencia y determinación de marcadores neurales específicos.

## **5. Inmunocitofluorescencia**

Las células en cultivo, se fijaron con paraformaldehído (PFA) (Aname, 157-4-100) al 4% durante 30 min en agitación suave y después se lavaron 3 veces con PBS para eliminar los restos de PFA. A continuación, los cubreobjetos se incubaron con PBS (para la determinación de proteínas de membrana como CD15) o con PBS + tritón X-100 (Roche, 10789704001) al 0,1% (para proteínas de localización intracelular) durante 15 minutos en agitación, tras lo cual se procedió al bloqueo de las uniones inespecíficas de los anticuerpos mediante incubación con albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma, A3059) al 3% en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente. Inmediatamente tras el bloqueo se realizó la incubación con los anticuerpos primarios dirigidos contra TBR2 (ab23345, Abcam), CD15 (ab119844, Abcam), SOX2 (ab97959, Abcam),  $\beta$ III-tubulina (ab41489, Abcam), GFAP (Z0334, Dako), Oligo-O1 (MAB5540, Chemicon) y CNPase (ab6319, Abcam) previamente diluidos 1/100 en PBS + BSA al 3%, esta incubación se realizó durante 16 horas a 4°C en una cámara húmeda. Tras esta incubación con el anticuerpo primario, los cubreobjetos se lavaron con PBS 1X y se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda oscura. Los anticuerpos secundarios utilizados en los estudios por inmunocitofluorescencia fueron el Alexa Fluor® 568 anti-*mouse* (A-11004, Invitrogen), Alexa Fluor® 488 anti-*rabbit* (A-11008, Invitrogen), Alexa Fluor® 488 anti-*mouse* (A-11001, Invitrogen), Alexa Fluor® 647 anti-*rabbit* (A-21245, Invitrogen), Alexa Fluor® 647 anti-*chicken* (A-21449, Invitrogen) y Alexa Fluor® 568 anti-*chicken* (A-11041, Invitrogen). Tras la incubación con el anticuerpo secundario los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS 1X y se realizó el montaje de los cubreobjetos sobre portaobjetos (Pearlan,

50024) utilizando el medio de montaje *Fluoroshield™* con DAPI (Sigma, F6057). Las imágenes de las inmunocitofluorescencias se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus, URFL-T).

## **6. Western-blot**

La técnica de Western-blot (Towbin, Staehelin et al. 1979) permite la detección de proteínas de una mezcla mediante el uso de anticuerpos específicos contra la proteína de interés, previa electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

### **6.1. Preparación de las muestras para Western-blot**

Las muestras que se han utilizado para la determinación de la presencia de proteínas específicas mediante western-blot se obtuvieron a partir de extractos celulares de los cultivos primarios de LA. Las células se sembraron en placas de cultivo de 100mm de diámetro (Nunc, 150350) de las que se extrajo la proteína para los posteriores análisis de WB.

Para extraer la proteína de las células en cultivo, se lavaron con PBS no estéril y se lisaron con tampón RIPA (20 mM sodium phosphate, pH 7.4, 140 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 0.1%  $\beta$ -glycerol phosphate and complete protease and phosphatase inhibitor cocktails, Roche Diagnostics), con la ayuda de un *scraper* (Nunc, 179693) y se recogió el extracto celular en un tubo *Eppendorf* para proceder a la completa homogenización utilizando un sonicador (Hielscher, UP50H). Las muestras se centrifugaron a 13500 revoluciones por minuto (rpm) en una microcentrífuga (Labnet) a 4°C durante 15 minutos y los sobrenadantes se utilizaron para el estudio de Western Blot.

En estos extractos se midió la concentración de proteína con el objetivo de aplicar en el gel la misma cantidad para cada una de las muestras. La cantidad de proteína total presente en los extractos celulares se cuantificó según el método de *Bradford* (Bradford 1976) y utilizando el kit comercial Bio-Rad *Protein Assay* (Bio-Rad). Este método se basa en el hecho de que el máximo de absorbancia de una solución ácida de azul de *Coomassie brilliant G-250* cambia desde 465nm hasta 595nm cuando se produce la unión a proteína. De esta forma, y aplicando la ley de *Lambert-Beer*, se puede determinar la concentración

proteica de un extracto por interpolación a una recta patrón construida a partir de la absorbancia determinada para varias soluciones de BSA (albúmina de suero bovino, fracción V, Sigma) de entre 0 y 0,5 mg/ml.

A cada muestra se añadió entonces el volumen correspondiente de tampón de ruptura 5X (Tris-HCl 250 mM pH 6.8, DTT 50 mM, SDS 10 %, azul de bromofenol al 0.5 % y glicerol al 50 %) y por último, se igualó el volumen final en todas las muestras con agua destilada. Una vez se obtuvo una mezcla homogénea tampón de ruptura-extracto, se hirvieron las muestras durante 5 minutos a 100 °C. Acabado este proceso, las muestras ya estaban listas para ser cargadas en el gel.

El protocolo de Western-blot puede dividirse en tres etapas: la separación electroforética de las diferentes proteínas de la muestra, la transferencia de estas proteínas a una membrana de nitrocelulosa, y la detección y visualización de las bandas de proteína que nos interesan mediante anticuerpos específicos dirigidos contra ellas.

## **6.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida**

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) es el sistema más clásico empleado para resolver mezclas de proteínas en función de su peso molecular. Para ello se trata el extracto proteico con un tampón de ruptura que contiene SDS. El SDS confiere carga negativa a todas las proteínas manteniendo la relación carga/masa constante. Finalmente, se hace correr la solución proteica con tampón de carga a través de un gel de acrilamida-bisacrilamida bajo la acción de un campo eléctrico.

En este tipo de electroforesis se emplean dos geles, cada uno de ellos con diferente concentración de acrilamida: (1) Un gel concentrador (*stacking*) y (2) un gel separador (*separating*). El gel concentrador tiene una concentración final de acrilamida del 5%, y su función es la de apilar todas las proteínas en un mismo punto justo en el inicio del gel separador. El gel separador tiene una concentración de acrilamida variable entre 8 y 15%, y su función es la de separar las proteínas de la muestra en función de su tamaño.

El gel separador está formado por Tris-Cl 0.4 M pH 8.8, SDS al 0.1 % y la cantidad de acrilamida-bisacrilamida correspondiente al % que deseemos en el gel (a partir de la solución *stock* de acrilamida al 30%). A esta mezcla se

añadieron los dos catalizadores de la polimerización, TEMED al 0.06 % y persulfato amónico (APS) al 0.1 % (se obtiene a partir de una solución concentrada al 10%). El gel concentrador contiene Tris-HCl 0.126 M pH 6.8, SDS al 0.1 %, acrilamida al 5%, bisacrilamida al 0.135 %, TEMED al 0.1% y APS al 0.1 %. Para preparar el gel definitivo, primero se deposita el gel separador en el *casting*, y se deja polimerizar. Una vez formado, se deposita el segundo encima, junto con una pieza de plástico (peine) que sirve para formar los pocillos en los cuales se deposita la muestra.

La electroforesis se realizó en una cubeta *MiniProtean II* (Bio-Rad). El tampón de electroforesis, preparado a partir de una solución concentrada 10X, contiene glicina 192 mM, Tris-HCl 25 mM y SDS 0.1 %.

Una vez preparados los geles de poliacrilamida y montados en la cubeta de electroforesis, se llenaron los dos compartimentos, interior y exterior, con tampón de electroforesis (cubriendo así los pocillos). A continuación, se cargaron las muestras en los pocillos y se puso en marcha la electroforesis aplicando una intensidad de corriente adecuada al número y grosor de los geles. Generalmente, se aplica una intensidad de 20 mA por gel en geles delgados (de 0.75 mm de grosor) y de 40 mA por gel en geles gruesos (de 1.5 mm de grosor).

Al finalizar la electroforesis, se sacaron los geles y se desechó el gel concentrador, quedándonos con el gel separador que contiene las proteínas. A continuación, se sumergió el gel separador en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20 %, pH 7.2) para eliminar los restos de SDS, hasta que se inició la transferencia.

### **6.3. Transferencia de las proteínas a una membrana**

La transferencia es una técnica mediante la cual las proteínas del gel se electrotransfieren a una membrana (generalmente de nitrocelulosa o PVDF) de forma que quedan inmovilizadas y expuestas al ataque de los anticuerpos. La resolución proteica que se ha producido durante la electroforesis se mantiene inalterada. La transferencia se realizó con el *Miniprotean II* de Bio-Rad en condiciones húmedas.

Para ello, se colocó en el *cassette* de transferencia, la membrana, el gel y el resto de los elementos de la transferencia tal y como indica el fabricante. A continuación, se conectó la transferencia a 100 V durante 30-90 minutos, dependiendo del grosor del gel y del peso molecular de la proteína a detectar.

Acabada la transferencia, se pudo teñir la membrana con rojo *ponceau S* durante unos 10 s. El rojo *ponceau S* es un colorante general de proteínas y permite saber si la transferencia ha sido correcta. Para eliminar el colorante, se realizan varios lavados de la membrana con agua destilada.

#### **6.4. Incubación con anticuerpos específicos y revelado de la membrana**

Este proceso consta básicamente de cuatro etapas: Bloqueo de la membrana, incubación con el anticuerpo primario, incubación con el anticuerpo secundario y revelado de la membrana. La primera fase consiste en incubar la membrana en una solución que contiene una proteína inespecífica (albúmina sérica bovina, BSA) para evitar que tanto el anticuerpo primario como el secundario se unan de forma inespecífica a la membrana. La segunda etapa permite que el anticuerpo primario se una de forma específica a las proteínas que se han transferido a la membrana. En la tercera etapa, se consigue formar un complejo entre el anticuerpo primario y el secundario, que tiene conjugada la peroxidasa de rábano. En la etapa final, de revelado de la membrana, es la enzima peroxidasa la que, tras reaccionar con el sustrato adecuado, da lugar a un producto fluorescente que permite detectar las bandas correspondientes a la proteína de interés.

El proceso de bloqueo de la membrana se realizó utilizando PBS, que contenía BSA al 3% y *Tween 20* al 0.05%, durante una hora a temperatura ambiente y en agitación continua. Alternativamente, se puede bloquear durante uno o dos días a 4°C. En este caso es necesario añadir azida sódica al 0.05% para evitar posibles contaminaciones.

La incubación de la membrana con el anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4°C y en agitación continua. El anticuerpo se diluyó en el mismo tampón de bloqueo utilizado en el paso anterior. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-TBR2 (Abcam, ab23345) y anti- $\beta$ III-tubulina (Abcam, ab78078) diluidos 1/1000 veces en PBS-BSA al 3%, durante toda la noche, a 4°C y en constante agitación. Como proteína control de normalización de carga de proteína se utilizó la  $\beta$ -actina. El anticuerpo primario, la  $\beta$ -actina (Sigma, A3854), se diluyó 1:25000 en PBS-BSA al 3% y se incubó durante 1 hora a RT en agitación constante.

Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron con PBS-Tween-20 (Sigma, P1379) al 0,05% en tres lavados de 10 minutos cada uno, posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario, diluido 1/5000 veces en PBS-leche al 5% durante 1 hora en oscuridad y a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios utilizados estaban conjugados a HRP y fueron: anti-*rabbit* (Amershan, NA9340) y anti-*mouse* (Amershan, NA931).

A continuación, se realizaron varios lavados de 10 minutos cada uno, con PBS-Tween 20 al 0.05%, y con agitación vigorosa. En este caso, se aumentó el volumen de tampón de lavado hasta 1.5 litros.

Una vez acabadas las incubaciones con los anticuerpos, la quimioluminiscencia se detectó usando el kit ECL *immunoblotting* (Millipore, WBKLS- 0500) siguiendo las indicaciones del fabricante. Acabada la incubación con el sustrato, se contactó la membrana con un film para autoradiografía especial, que se revela por los procedimientos habituales con el fin de visualizar las bandas de las proteínas a detectar.

## **7. RT-PCR semicuantitativa**

El análisis de la presencia y niveles de expresión génica de marcadores específicos de células progenitoras neurales se realizó mediante RT-PCR semicuantitativa. Para ello, se extrajo el RNA total de las células en cultivo primario de LA y LCF utilizando el reactivo *TRI Reagent*<sup>®</sup> (Sigma, T9424) y siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción de RNA de células en cultivo. El RNA obtenido se purificó mediante columnas de afinidad utilizando el kit *RNeasy Micro* (Quiagen, 74004) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de realizar la transcripción reversa, se determinó la cantidad y calidad del RNA obtenido de cada muestra utilizando los RNA *nanoassay*<sup>®</sup> *Lab Chips* (Agilent Technologies) y el *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies). Con este análisis se obtuvo el valor RIN (RNA *integrity number*) que osciló entre 9,3 y 9,8, indicando que el RNA obtenido tenía una excelente calidad para posteriores análisis de expresión génica en función del software *Agilent 2100 RIN*.

Una vez analizadas las concentraciones de RNA obtenidas, se realizó la transcripción reversa utilizando 5 µg de RNA mediante el kit comercial *Superscript II RT* (Invitrogen, Carlsbad, CA), añadiendo 100ng de *Random primers*

(Cat.C118A, Promega, Southampton, UK) y 20 unidades de *SUPERase-in RNase inhibitor* (Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, UK) para prevenir la degradación del RNA.

Gen	Nº GenBank	Longitud de banda	Secuencia primer forward	Secuencia primer reverse
cd15	NM_002033	339bp	5'-GGCGGACTCGGACGTCCTTTGTGC-3'	5'-CCAGCGAGCAACGCGTTGCGCC-3';
TBR2	NM_005442	291bp	5'-GGCAAAGCCGACAATAACATGC-3'	5'-GGCAGTCACTGCAATGAATTGCG-3'
Sox2	NM_003106	381bp	5'-GGCAGCTACAGCATGATGCAGG-3'	5'-GGACATGTGAAGTCTGCTGG-3'
GAPDH	BC025925	189bp	5'-TGGTATCGTGGAAAGGACTCATGAC-3'	5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAAGC-3'

Tabla 4- Relación de *primers* utilizados para la RT-PCR

Tras la reacción de retrotranscripción, 200ng de cDNA obtenidos de cada muestra se utilizaron como molde para la PCR, la cual se realizó en un volumen total de 20µL en los que se incluyeron 0,4µM de cada *primer* (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA) 1x MyTaq *buffer* de reacción y 1 unidad de MyTaq HS DNA polimerasa (Bioline, Ecogen, España). Se analizaron los niveles de expresión de los genes CD15, TBR2 y Sox2, y como gen control se utilizó el GAPDH para normalizar cada una de las PCRs. Los *primers* utilizados para cada gen se diseñaron de acuerdo a las secuencias derivadas del GenBank y corresponden a los nucleótidos que se reflejan en la Tabla 4. Las condiciones del programa en el termociclador fueron: un paso inicial de activación a 95°C durante 3 minutos, seguidos de una desnaturalización a 95°C durante 30s, el anillamiento durante 30 segundos y la extensión a 72°C durante 30s para finalizar con un paso de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

El número de ciclos y la temperatura de anillamiento se optimizaron para cada gen siendo los siguientes: CD15 39 ciclos y 62°C; TBR2 55 ciclos y 58°C, Sox2 38 ciclos y 60°C y GAPDH 27 ciclos y 60°C. Una vez finalizada la PCR, 5µL del producto de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 1,5% y las diferentes bandas se cuantificaron utilizando el Bio-Rad Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA).

## **8. Modelo de MMC en conejo**

### **8.1. Generación de MMC quirúrgico en modelo de conejo**

El modelo experimental de MMC en conejo se desarrolló utilizando hembras de la cepa *New Zealand* a día 23 de gestación. Los animales se anestesiaron con una dosis combinada de medetomidina (0,25mg/kg) y ketamina (15mg/kg) y se monitorizaron constantemente mediante pulsioximetría. La anestesia fue mantenida durante la cirugía con isoflurano 1,5- 2,5% inhalado. Este procedimiento fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal del Hospital Vall d' Hebrón (nº CEEA 15/12).

A las conejas gestantes se les realizó una laparotomía intraumbilical y se expuso el útero multilobulado, se hizo también una pequeña histerectomía con la fijación de las membranas y sólo se expuso la región lumbar de cada uno de los fetos a operar (Fontecha, Peiro et al. 2007; Fontecha, Aguire et al. 2010). La creación de la lesión mediante cirugía consistió en una resección de la piel en forma de óvalo y también de la musculatura paravertebral de la región lumbar, posteriormente se realizó una laminectomía de tres arcos vertebrales y una apertura de la duramadre para exponer la médula espinal y permitir la salida del LCF (Figura 45). De cada hembra gestante se operaron un máximo de dos fetos para minimizar la posibilidad de aborto. Los fetos no operados formaron parte del grupo de fetos control.

Con el fin de imitar la degeneración del tejido medular que se observa en el MMC a medida que la gestación va avanzando, se generó un modelo de lesión medular aguda mediante la aplicación de un tóxico sobre la médula espinal en el momento de creación del defecto de forma que provocase la abrasión medular. El tóxico empleado fue el detergente SDS (Applichem, A2263), con el que se realizaron diferentes ensayos, variando tanto la concentración de SDS aplicada sobre la médula expuesta como el tiempo de exposición al detergente (Figura 45), para establecer las condiciones óptimas de aplicación del tóxico con las que se llegaba a reproducir el daño neural provocado en la médula espinal que se observa en el defecto de un MMC congénito.

En el modelo de lesión medular aguda con SDS, tras la inducción de la lesión química sobre el tejido medular, los fetos fueron inmediatamente sacrificados y se extrajo la zona lumbar de cada animal para su estudio histológico e inmunohistoquímico. La zona lumbar de los fetos se fijó con formalina (DiaPath- F0047) al 10% durante como mínimo una noche, al día

siguiente se incluyeron las zonas lumbares en bloque de parafina y se realizaron cortes histológicos en el micrótopo (Microm, HM 340E) para el posterior análisis por técnicas de histología e inmunohistoquímica.

Las diferentes condiciones a las que se sometieron los distintos fetos se resumen en la Tabla 5. La lesión química inducida en el tejido medular por el detergente a las diferentes condiciones se ensayaron en 4 fetos (N=4 por condición).

[SDS] [%]	0,1	0,1	0,5	0,5	1	1	10	10
Tiempo [min]	3	5	3	5	3	5	3	5

Tabla 5- Condiciones de concentración de detergente y tiempo de utilización para la generación del MMC en conejo

Para poder valorar cuáles eran las condiciones óptimas de tiempo y concentración del detergente a utilizar se valoró el daño neural provocado en cada una de las situaciones, midiendo los cambios en la relación entre la materia gris y la materia blanca de cada médula espinal expuesta a las diferentes condiciones (Bellenberg, Schneider et al. 2015; Henke, Gorgas et al. 2016).

## 9. Trasplante celular en MMC modelo de conejo

El trasplante celular se ensayó en modelos animales de MMC, tanto en modelo experimental de conejo como en el de oveja. Las células que se utilizaron para el trasplante celular procedían del cultivo primario de LCF de origen humano, obtenidas a partir de muestras de LCF de pacientes con MMC.

Con el fin de localizar las células tras el trasplante, éstas fueron transfectadas con un virus que expresaba la proteína fluorescente roja RFP (*Red Fluorescent Protein*). Para ello se utilizó un virus (LscC-RFP-W) que se diluyó hasta una concentración de 10 m.o.i. (partículas víricas/célula) en medio *DMEM with high glucose* (Biowest, L0104-500) + antibiótico/antimicótico 1X (Biowest, L-0010). La monocapa de células de LCF a infectar se lavó con PBS estéril (Biowest, L0615) y se incubó durante una noche con la dilución del virus en el medio a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Al día siguiente se retiró el medio con virus y se sustituyó por medio de proliferación.

### 9.1. Trasplante celular en modelo *in vivo* de MMC en conejo

Cuando las células infectadas alcanzaron un 70-80% de confluencia, se procedió a su tripsinización y conteo utilizando una cámara de *Neubauer* (Brand, 10360141). Se utilizaron 500.000 células para el trasplante de cada feto de conejo inmersas en un *scaffold* de fibrina. Para la preparación del *scaffold* con las células de LCF, se separó el volumen necesario de las células tripsinizadas para contener 500.000 células y se llevaron a un volumen final de 100  $\mu$ l en medio *DMEM with high glucose* (Biowest, L0104-500) + antibiótico/antimicótico (Biowest, L-0010). Al medio que contenía las células en suspensión se le añadieron 300  $\mu$ l de plasma humano, obtenido tras la centrifugación de sangre de voluntarios, previamente recogida en tubos de recolección de sangre (BD Vacutainer®, 363080) y tras mezclarlo por pipeteo se sembró la mezcla en pocillos de una multiplaca de 24 pozos (Sardsted, 83.3822) y se dejó gelificar durante 30 min a temperatura ambiente.

Para realizar las pruebas de trasplante celular se utilizó el modelo de MMC químico puesto a punto en conejo, con las concentraciones y tiempo óptimos del detergente, de manera que el animal gestante se intervino a día 23 de gestación, y la lesión se realizó como se ha detallado previamente. Cuando la médula se expuso y se puso en contacto con el detergente se lavó exhaustivamente con suero salino (Grifols, 605137) antes de colocar las células.

El constructo formado por células más el *scaffold* y que se prepara a base de la mezcla de medio de cultivo y plasma se depositó sobre la lesión del MMC en el feto del conejo, inmediatamente después de crear la lesión quirúrgica en la zona lumbar del feto, tras lo cual se cubrió la zona lesionada con una membrana comercial (TissuDura®, Baxter, 0600096) con propiedades físico-químicas similares a la duramadre para proteger la zona del trasplante celular y mantener el constructo celular en la zona de aplicación. Finalmente, se procedió al cierre quirúrgico del defecto cubriendo la zona con la capa de piel retirada previamente al realizar la laminectomía y procediendo a la sutura continua utilizando hilo de sutura no reabsorbible (PROLENE™ 7-0, Ethicon, EP8735H).

En la Figura 49 se muestra el proceso de reparación de la lesión del MMC con la aplicación del *scaffold* colonizado por las células. En la Figura 48 se muestra en detalle el constructo celular, la colocación del parche sobre la lesión tras la implantación de las células en el *scaffold* para cubrir la lesión y el cierre de la piel del animal mediante un *flap* de piel y sutura.

A día 30 de gestación, se procedió a la extracción de los fetos mediante cesárea tras anestesia de la coneja gestante. Tras la eutanasia de los fetos, se recogieron las zonas lumbares y se congelaron inmediatamente tras la extracción embebidas en medio de congelación de tejidos (OCT *compound*, Tissue-Tek, 62550-12) por inmersión paulatina en nitrógeno líquido para el posterior análisis y localización de la presencia de las células implantadas.

## **10. Modelo de MMC en oveja**

El modelo de oveja utilizado ha sido descrito con anterioridad y se ha utilizado ampliamente por nuestro grupo de investigación (Copeland, Bruner et al. 1993; Meuli, Meuli-Simmen et al. 1995; Bruner, Tulipan et al. 1999; Tulipan, Hernanz-Schulman et al. 1999; Fontecha, Peiro et al. 2009; Encinas, Germani et al. 2010; Encinas, Germani et al. 2010; Peiro, Fontecha et al. 2013). El estado de gestación de las ovejas utilizadas en el estudio se confirmó días antes de la intervención mediante un examen ecográfico, en el que se pudo determinar también el número de fetos por cada oveja gestante.

### **10.1. Creación del MMC quirúrgico en feto de oveja**

La lesión quirúrgica de MMC se creó en el día 75 de gestación, tras la anestesia de la oveja gestante mediante administración intravenosa de 0.5 mg/kg de midazolam y 0.02 mg/kg de buprenorfina, y posterior administración de 5 mg/kg propofol por vía intravenosa y 3% de isoflurano inhalado. La cirugía se realizó mediante laparotomía intraumbilical por la línea media para exponer el útero y se procedió a la realización de la histerectomía, tal y como se muestra en la Figura 16. Una vez abierto el útero se retiraron aproximadamente unos 200-300 ml de líquido amniótico. Una fracción de entre 20-30 ml del líquido amniótico recogido se utilizó para el establecimiento de cultivos celulares, mientras que la otra parte se mantuvo a temperatura ambiente y en condiciones estériles hasta su reinfusión al final de la cirugía.

Una vez realizada la histerectomía y fijadas las membranas internas del saco amniótico para evitar su desprendimiento, se expuso la zona lumbar del feto y se procedió a la creación del defecto quirúrgico de MMC. De esta manera, se procedió a la resección de la piel y de los músculos paravertebrales y se practicó la laminectomía de tres vértebras lumbares y la exposición de la médula espinal tras la apertura de la duramadre, de manera que se reprodujo la

situación que se presenta en el MMC humano y que implica la exposición del tejido neural y la pérdida de LCF hacia el LA a través del defecto del MMC. Una vez finalizada la cirugía de creación del defecto, el LA que había sido preservado en el inicio de la intervención se reintrodujo en el saco amniótico y se procedió a la administración de 50mg de cefoxitina y al cierre tanto del útero como del abdomen de la oveja gestante. Las ovejas recibieron también un antibiótico administrado por vía intramuscular (1g de cefoxitina) y analgesia transdérmica (parche de fentanilo).

## **10.2. Trasplante celular y cierre quirúrgico del defecto de MMC en modelo fetal ovino**

La reparación del defecto del MMC creado en el modelo fetal de oveja a día 75 de gestación, se realizó 20 días más tarde, cuando la gestación de las ovejas se encontraba en el día 95 de gestación.

Las células necesarias para el trasplante celular se prepararon justo antes de iniciar la cirugía en la oveja gestante y siguiendo la misma metodología utilizada en el modelo de conejo y descrita en el apartado anterior; con la diferencia de que en el modelo de oveja se preparó un constructo de mayor tamaño y con un mayor número de células de LCF humano. En el modelo fetal de oveja, para el trasplante celular se utilizaron 1.000.000 de células que fueron incluidas en el *scaffold* de fibrina. De la misma manera que en el modelo de conejo, las células de LCF fueron transfectadas con un virus (LscC-RFP-W) que expresaba la proteína fluorescente roja RFP (*Red Fluorescent Protein*) mediante infección vírica durante 16 h a una concentración de 10 m.o.i. (partículas víricas/célula).

Para la preparación del *scaffold* con las células de LCF, se separó el volumen necesario de las células tripsinizadas para contener 1.000.000 de células y se llevaron a un volumen final de 300  $\mu$ l en medio *DMEM with high glucose* (Biowest, L0104-500) + antibiótico/antimicótico (Biowest, L-0010). Al medio que contenía las células en suspensión se le añadieron 900  $\mu$ l de plasma humano, obtenido tras centrifugación de la de sangre de voluntarios previamente recogida en tubos de recolección de sangre (BD Vacutainer®, 363080) y tras mezclarlo por pipeteo se sembró la mezcla en un pocillo de una placa de cultivo celular de 12 pocillos (Nunc, 150628) y se dejó gelificar durante 30 min a temperatura ambiente.

Para la cirugía de reparación del defecto el procedimiento utilizado fue muy similar al de la primera cirugía, es decir, se practicó secuencialmente una laparotomía en la línea media para permitir la exposición del útero, una histerectomía fijando las membranas internas del saco amniótico y se expuso la zona lumbar del feto con MMC para proceder al trasplante celular y al cierre del defecto. Una vez expuesta la zona lumbar del feto con MMC se procedió al trasplante celular mediante la aplicación del *scaffold* con células sobre el defecto del MMC. El grupo de fetos control (animales con MMC pero sin células) recibió el trasplante del *scaffold* de fibrina pero sin células. El constructo gelificado se recogió utilizando unas pinzas quirúrgicas y se extendió cuidadosamente sobre la médula espinal expuesta para que entrase en contacto con el tejido neural. Una vez trasplantadas las células, se procedió al cierre del defecto mediante la aplicación sobre el constructo celular de una membrana comercial de TissuDura® (Baxter, 0600096) y al cierre quirúrgico del defecto del MMC mediante unión por sutura continua con hilo no reabsorbible (PROLENE™ 5-0, Ethicon, EPH8716H) de los extremos de piel que bordean el defecto del MMC. Una vez cerrado el defecto se procedió a la administración de 50mg de cefoxitina en el líquido amniótico y al cierre por sutura secuencial del útero y el abdomen de la oveja gestante. Las ovejas recibieron también un antibiótico administrado por vía intramuscular (1g de cefoxitina) y analgesia transdérmica (parche de fentanilo).

### **10.3. Cesárea y extracción de tejidos en modelo fetal ovino**

La última de las intervenciones quirúrgicas practicadas a las ovejas se realizó al término de la gestación, entre los 140 y 145 días, momento en el que se practicó una cesárea para la extracción de los fetos. A los corderos neonatos se les mantuvo con vida durante 12 horas para la realización de un examen de la capacidad neurológica y motora mediante la valoración de los siguientes parámetros: capacidad de mantenerse en pie durante más de 5 minutos, habilidad para caminar más de 5 metros, continencia de esfínteres, malformaciones de la columna, ataxia de las extremidades, disfagia, pérdida de LCF en la zona del MMC y porcentaje de epitelización del defecto de MMC con el fin de analizar el efecto de la reparación en corderos nacidos con el MMC creado quirúrgicamente. A las 12 horas de vida, los corderos se eutanasiaron con 200mg/kg de tiopental aplicados por vía intravenosa bajo control veterinario y se procedió a la recogida de muestras. Las zonas lumbares se extrajeron mediante disección quirúrgica justo tras la eutanasia del animal y el tejido obtenido fue inmediatamente congelado tras ser embebido en medio OCT para

congelación de tejidos (OCT *compound*, Tissue-Tek, 62550-12) y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento para análisis histológicos y por inmunofluorescencia.

## **11. Tinciones histológicas**

### **11.1. Tinción hematoxilina/eosina**

Con el fin de evaluar la morfología y realizar un análisis de las estructuras lumbares con detalle, se utilizó la tinción de hematoxilina y eosina. La hematoxilina es ampliamente utilizada en histología para teñir componentes aniónicos de los tejidos, a los que da una coloración violeta, y en especial tiñe intensamente los núcleos de las células, dado que éstos contienen ácidos nucleicos ricos en radicales ácidos. La eosina por el contrario debido a su carácter ácido y polaridad negativa se une a sustancias básicas y genera una tinción de color rojo intenso coloreando componentes y orgánulos citoplasmáticos, colágeno y fibras musculares, pero no tiñe los núcleos celulares.

Las secciones lumbares obtenidas de los fetos de los modelos animales de conejo u oveja fueron utilizadas para la obtención de cortes de tejido seriados de un grosor de 10µm y colocados sobre portaobjetos tratados con poly-L-lysina (VWR, 631-0107). Los tejidos procesados para su inclusión en bloques de parafina fueron seccionados utilizando un micrótopo (Leica, RM2245). Posteriormente, estas muestras fueron fijadas por tostado a 62°C durante 2 horas y después se desparafinizaron mediante la incubación en xileno y una gradación descendente de alcoholes, lavándolas 1 minuto con cada una de las diferentes soluciones: Xileno (Panreac, 251769-2714), alcohol 100%, alcohol 90%, alcohol 70%, alcohol 50% (VWR Chemicals, 83813.360) y agua destilada.

Una vez las muestras estuvieron desparafinadas se procedió a la tinción con hematoxilina y eosina. Por otro lado, los tejidos congelados en bloque de OCT se procesaron para seccionarlos utilizando un criostato (Leica, CM1850) e inmediatamente utilizados para su tinción histológica. Los portaobjetos que contenían los cortes de tejido se sumergieron en una solución de hematoxilina de Harris (VWR Chemicals, 351945S) durante 15 segundos, después se tiñó con una solución de eosina Y acuosa (Sigma, H110232) durante 5 segundos y se deshidrató en una escala ascendente en concentraciones de alcohol: alcohol 50%, alcohol 70%, alcohol 90% y alcohol absoluto y xileno. Para finalizar la preparación se montaron utilizando cubreobjetos de vidrio (VWR, 48393-081) y

medio de montaje DPX (Sigma, 06522) y se observaron en un microscopio óptico invertido (Olympus BX-61).

### **11.2. Tinción con reactivo de Nissl**

La tinción con violeta de cresilo tiñe de un azul violáceo la sustancia de *Nissl* que se encuentra en el citoplasma del conjunto de neuronas y glia que pueblan el sistema nervioso central y sirve para identificar la estructura neuronal en secciones del cerebro y de la médula espinal.

Los cortes de tejido con un grosor de 10 $\mu$ m obtenidos de la zona lumbar de los fetos del modelo de conejo u oveja se recogieron en portaobjetos tal y como se describe en el apartado anterior y se procedió a la tinción con *cresyl violet*. La solución de tinción del violeta de cresilo se preparó mediante la mezcla de los siguientes reactivos: 0.1 g de violeta de cresilo (Sigma, C5042) en 100 ml de agua destilada y justo antes de usar se añadieron unas gotas de ácido acético glacial (Sigma, 1005706) y se filtró.

Las secciones de tejido en los portaobjetos se sumergieron en la solución de *Cresyl Violet* durante 10 minutos y después se retiró el exceso de tinción mediante el lavado en agua destilada. Posteriormente, se deshidrataron gradualmente en soluciones de etanol (VWR Chemicals, 83813.360) mediante lavados en etanol al 50% (2min), etanol al 70% (2min), etanol al 90% (2min), etanol absoluto (3min) y xileno (Panreac, 251769-2714) 1 minuto. Posteriormente, se montaron con cubreobjetos (VWR, 48393-081) y líquido de montaje para histología DPX (Sigma, 06522). Las histologías de los tejidos se valoraron utilizando un microscopio óptico invertido (Olympus BX-61).

## **12. Localización celular mediante fluorescencia en tejido medular**

El estudio por técnicas de detección de fluorescencia se realizó en el tejido de las secciones lumbares de los modelos animales que fueron trasplantados con células marcadas con fluorescencia para su identificación y localización. Los bloques de tejido congelado en OCT de los fetos de los modelos de MMC en conejo u oveja se seccionaron utilizando un criostato (Leica, CM1850). Las secciones transversales de 10 $\mu$ m de grosor obtenidas de la zona lumbar de los fetos fueron colocadas sobre portaobjetos tratados con poly-L-

lysina y utilizadas para la localización mediante fluorescencia de las células trasplantadas en los estudios *in vivo*. Los cortes de tejido fueron fijados por inmersión durante 10 minutos en acetona (Sigma, 34850) previamente enfriada a -20 °C y después fueron montados directamente utilizando un cubreobjetos de vidrio (VWR, 48393-081) y medio de montaje Fluoroshield™ con DAPI (Sigma-Aldrich, F6057). Finalmente, se utilizó un microscopio de fluorescencia (Olympus URFL-T) para la detección y localización de las células trasplantadas en base a la expresión de la proteína fluorescente roja (RFP, *Red Fluorescent Protein*), la cual es expresada por las células debido a la transfección con un vector vírico (LscC-RFP-W) previa al trasplante *in vivo*.



# Resultados



## 1. Cultivo de las muestras

### 1.1. Establecimiento del control positivo

Como paso previo al estudio del comportamiento de las células con características de progenitores neurales que se preveía encontrar tanto en el LA como en el LCF, se optimizó el cultivo celular de neuroesferas con el fin de tener una población de referencia para estas células y un control positivo de células que expresen los marcadores de progenitores neurales. Se consiguieron aislar neuroesferas de la médula espinal tanto de corderos como de humanos y se estableció el cultivo primario como se observa en la Figura 24.

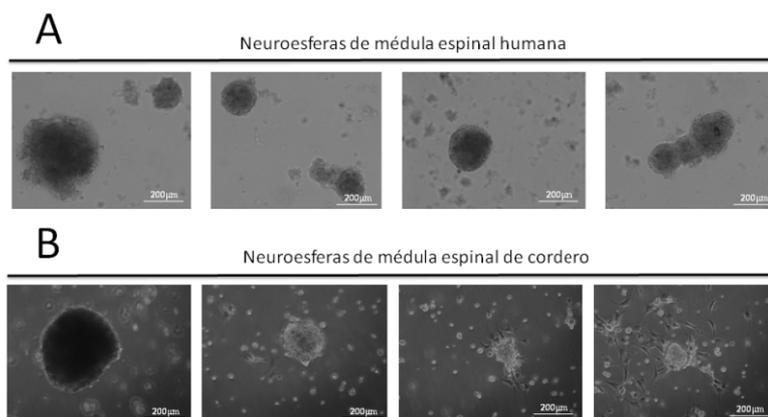


Figura 24- Cultivo de neuroesferas como control positivo para las NPCs a partir de la médula espinal humana (A) y médula espinal de cordero (B)

En este cultivo de neuroesferas se determinó la expresión de marcadores de progenitores neurales Sox2 y Nestin, tal y como se describe en la literatura

(Vishwakarma, Bardia et al. 2014; Chang, Su et al. 2015). Como se puede observar en la Figura 25 las neuroesferas en cultivo expresan marcadores específicos de progenitores de linaje neural.

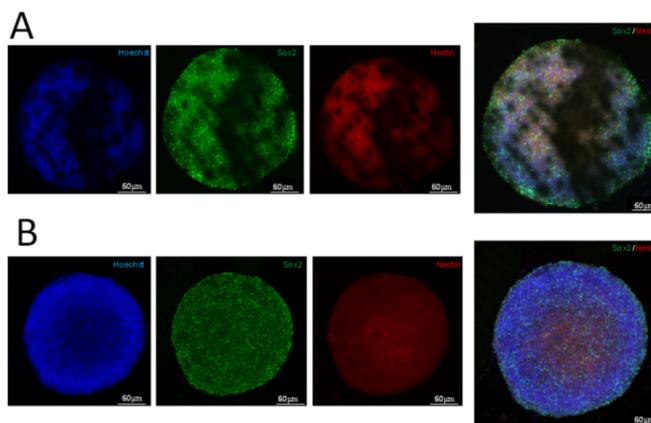
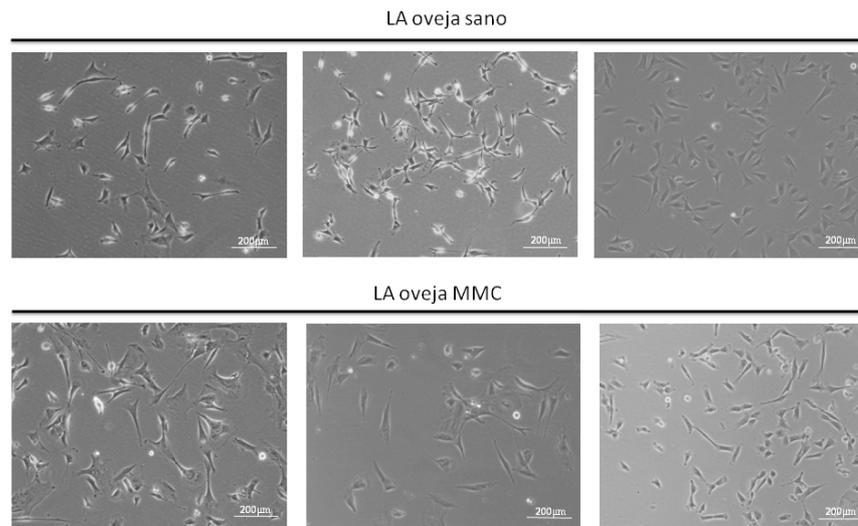


Figura 25- Inmunitofluorescencias de marcadores específicos de NSCs en neuroesferas aisladas a partir de médula espinal humana (A) y médula espinal de cordero (B)

## 1.2. Cultivo de LA

### 1.2.1. Muestras de origen ovino

A continuación se procedió al establecimiento del cultivo primario de afSCs de muestras de LAs de ovejas. Se utilizaron tres ovejas para el estudio. Según el momento gestacional de recogida se clasificaron como sanas o lesionadas, así, las muestras de LA obtenidas justo antes de la primera cirugía, a los 75 días de gestación, se consideraron muestras de LA sano.



**Figura 26-** Cultivo de LA de oveja sana y con lesión de MMC

Sin embargo, cuando las muestras de LA fueron recogidas a día 95 de gestación, al reparar el MMC se clasificaron como patológicas. El crecimiento de las afSCs fue óptimo en el cultivo de ambos tipos de muestras de LA y como refleja la Figura 26, no se observaron bajo el microscopio óptico diferencias morfológicas entre las poblaciones sanas y con MMC ni tampoco diferencias según la de edad de recogida de las muestras.

### 1.2.2. Muestras de origen humano

En paralelo, se procedió al establecimiento del cultivo primario de células provenientes de LA humano. Para el estudio, se utilizaron cinco muestras de LA humano sano (sin defectos del tubo neural) y cinco muestras de pacientes con MMC de mujeres embarazadas entre las semanas 19 y 25 de gestación.

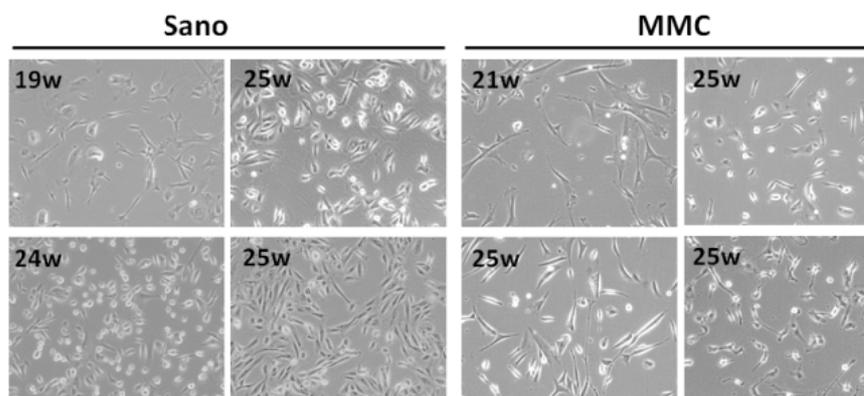


Figura 27- Establecimiento del cultivo primario de LA de pacientes sanos y con MMC

Como se muestra en la Figura 27 se consiguió un óptimo crecimiento de las afSCs humanas y bajo control microscópico se pudo evaluar que ambas poblaciones celulares crecían muy bien, no se podían observar diferencias morfológicas significativas entre las células derivadas de los fetos sanos y de aquellos afectados de MMC.

### 1.2.3. Aislamiento de clones en LAs

Dado que el LA presenta diferentes poblaciones celulares se hizo un estudio de separación de las distintas subpoblaciones celulares, mediante el aislamiento de clones a través de un método de dilución seriada de la muestra de LA o mediante el aislamiento manual de colonias picando una muestra de la base de la placa de cultivo.

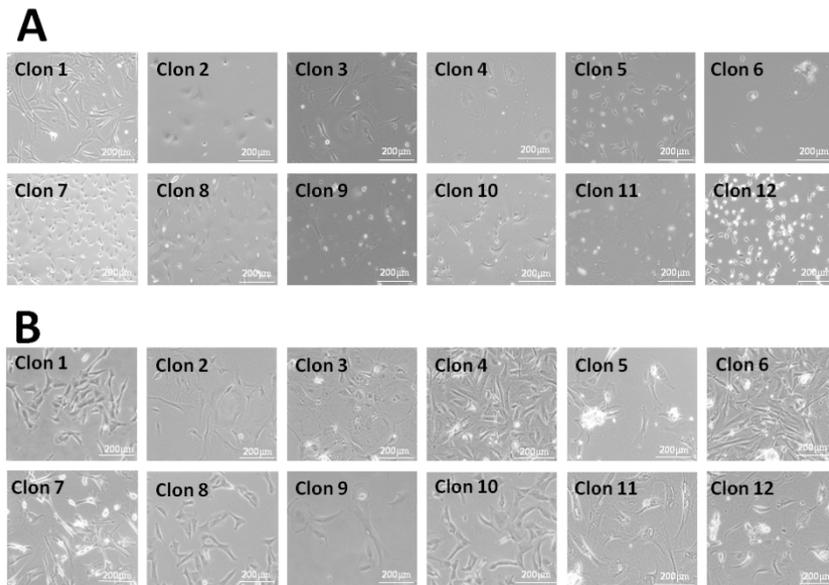


Figura 28- Diferentes clones aislados a partir de un mismo LA de oveja sano (A) como con MMC inducido quirúrgicamente (B)

De esta manera se consiguió la separación de diferentes clones celulares tanto en muestras de LA de oveja (Figura 28) como de humano (Figura 29). El aislamiento de clones se consiguió de manera satisfactoria recuperando diferentes poblaciones celulares y la expansión de cultivo primario de las mismas. Este cultivo permitió observar diferencias morfológicas en las distintas subpoblaciones celulares del LA, lo que se pudo utilizar como paso previo a la selección, al menos por sus características fenotípicas, de las NPCs.

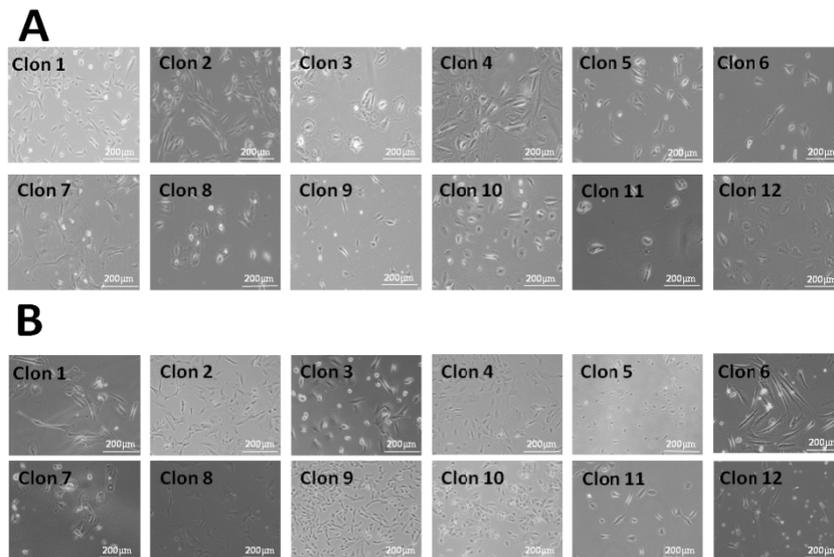
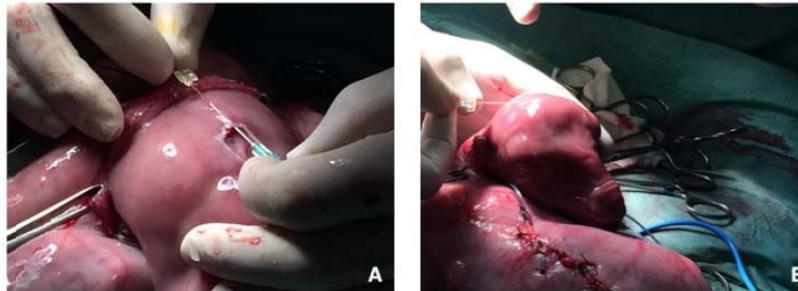


Figura 29- Clones aislados del LA de individuos sanos (A) y pacientes con MMC congénito (B)

### 1.3. Cultivo de LCF

#### 1.3.1. Muestras de origen ovino

El LCF de las ovejas se recogió mediante intervención quirúrgica, bien al final de la gestación desde el canal medular Figura 30A o bien de la cisterna magna (Figura 30B).



**Figura 30-** Métodos de recogida de LCF de oveja, del canal medular una vez realizada la lesión del MMC (A) y de la cisterna magna (B)

Se consiguió establecer el cultivo primario de estas muestras recogidas en cuatro corderos neonatos y no se observaron diferencias bajo el microscopio visible en el crecimiento de las células del LCF independientemente de si éste procedía de un feto sano o con el defecto del MMC (Figura 31A).

Los ratios de proliferación de las células derivadas del LCF en oveja se midieron a día 3 y 5, las células demostraron un crecimiento progresivo en cultivo primario. Los valores observados en el crecimiento de las células de LCF fueron de  $742 \pm 456 \%$  ( $p=0,05$ ) y de  $1021 \pm 320 \%$  ( $p=0,015$ ), respectivamente, con relación al tiempo 0, como se puede observar en la Figura 31B.

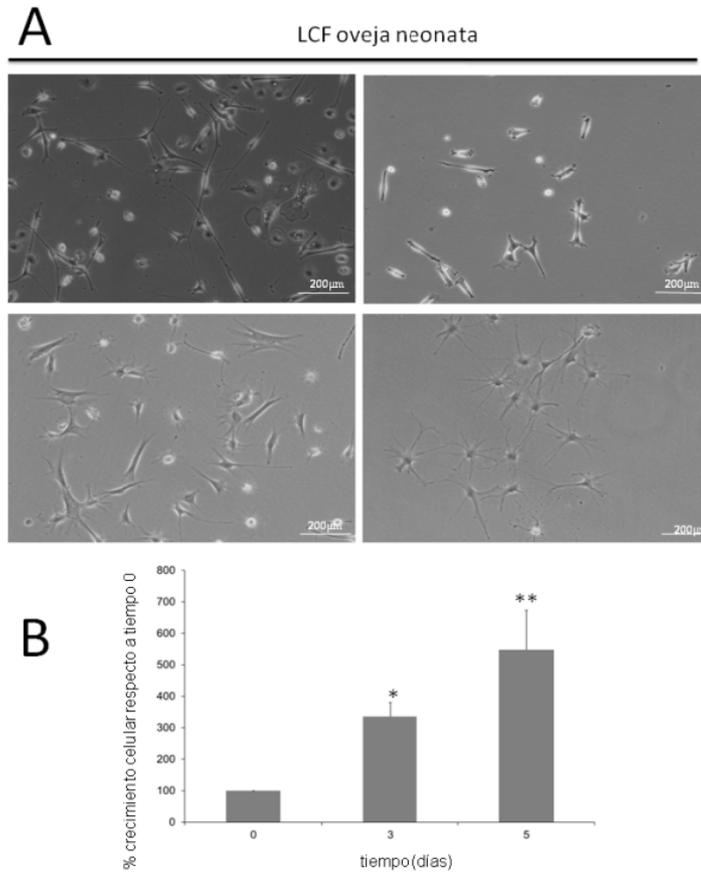


Figura 31- Cultivo primario de LCF de oveja (A) y gráfica de crecimiento celular (B)

### 1.3.2. Muestras de origen humano

Las muestras de LCF de origen humano se recogieron durante la cirugía fetal en la que se reparó el defecto de MMC, realizada entre la semana 20 y 26 de gestación, como aparece en la Figura 32A, tras la obtención de la muestra se procedió al establecimiento del cultivo primario (Figura 32B).

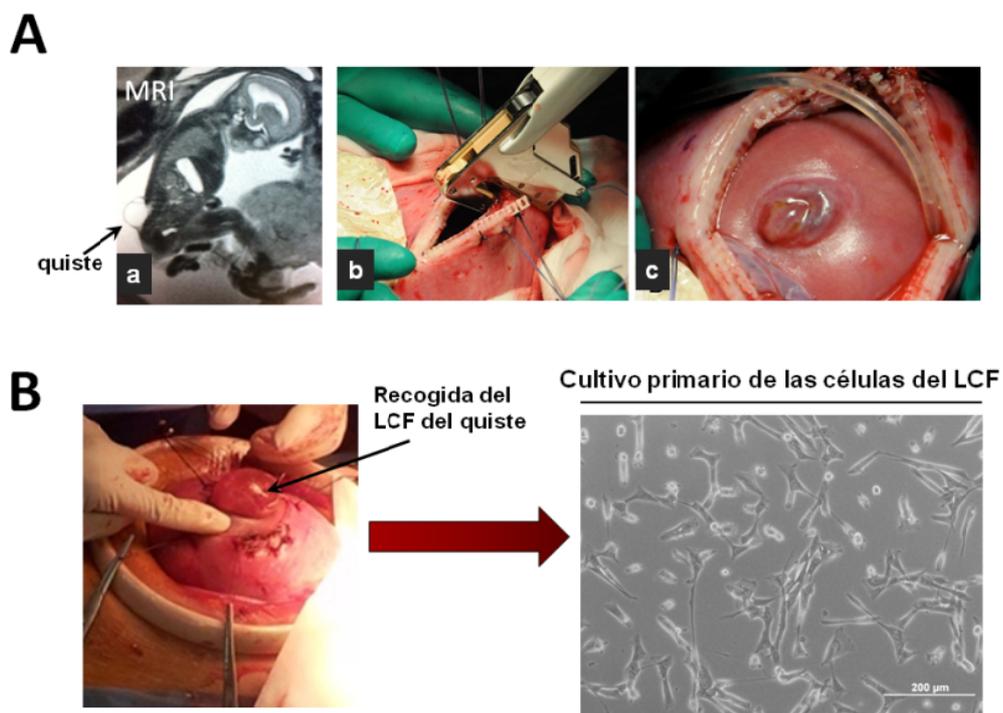
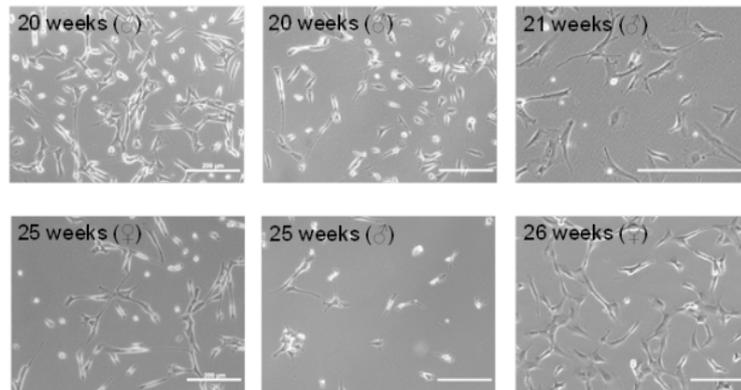


Figura 32- MMC cístico en el momento de la cirugía reparadora (A) y recogida del LCF del quiste y establecimiento del cultivo primario

El crecimiento de las células del LCF fue exitosa en los seis pacientes utilizados para el estudio, tal y como se muestra en la Figura 33A. Los ratios de proliferación en las células derivadas del LCF se midieron a día 3 y 5 de proliferación; estas células presentaron un crecimiento progresivo mostrando unos valores de proliferación celular del  $335 \pm 44\%$  ( $p=0,026$ ) y  $547 \pm 125\%$  ( $p=0,0027$ ) en los días 3 y 5 respectivamente en relación al día 0 (Figura 33B).

## A

Cultivo primario de células del LCF recogido del quiste de pacientes con MMC



## B

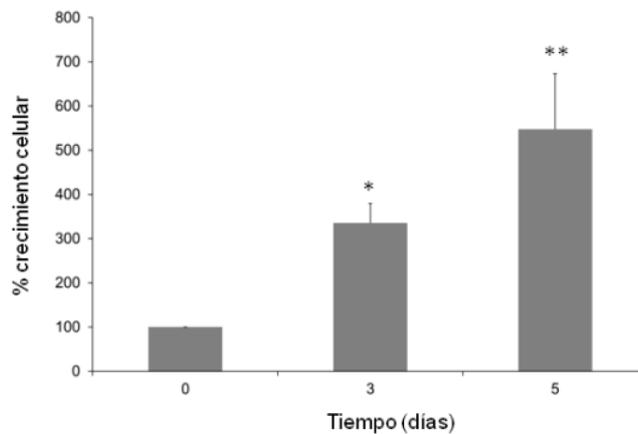


Figura 33- Cultivo primario de LCF de humano (A) y gráfica de proliferación celular durante 5 días (B)

## 2. Análisis de la presencia de NPCs en LAs

### 2.1. LA de origen ovino

Con el fin de determinar la presencia de células progenitoras neurales en muestras procedentes de LAs de oveja, se realizó el análisis de expresión de marcadores específicos por inmunocitofluorescencia y mediante WB. Para ello, se utilizaron muestras de LA sano (recogido en el momento de la creación de la lesión) y de fetos con defecto neural abierto del modelo de feto ovino con creación quirúrgica de la lesión de MMC (LA MMC), LA obtenido en el momento

de la reparación de la lesión en la segunda cirugía realizada a 95 días de gestación de la oveja.

Como se puede observar en la Figura 34A, se detectó la expresión positiva de los marcadores específicos de progenitores neurales CD90, CD15 y CD24 (Capela and Temple 2002; Doetsch 2003; Zhu, Wang et al. 2013; Vishwakarma, Bardia et al. 2014; Hosseini, Farahmandnia et al. 2015; Abdullah, Yaseen et al. 2016) exclusivamente en los LAs procedentes de muestras de fetos con MMC, mientras que no se detectó este marcaje en las células provenientes de los líquidos obtenidos de fetos sanos. Además, las células derivadas de los líquidos amnióticos de MMC no presentan marcaje para CD45 ni tampoco para CD34, lo que concuerda con las características de las células progenitoras neurales (Singh, Tripathy et al. 2013; Vinci, Ravarino et al. 2016).

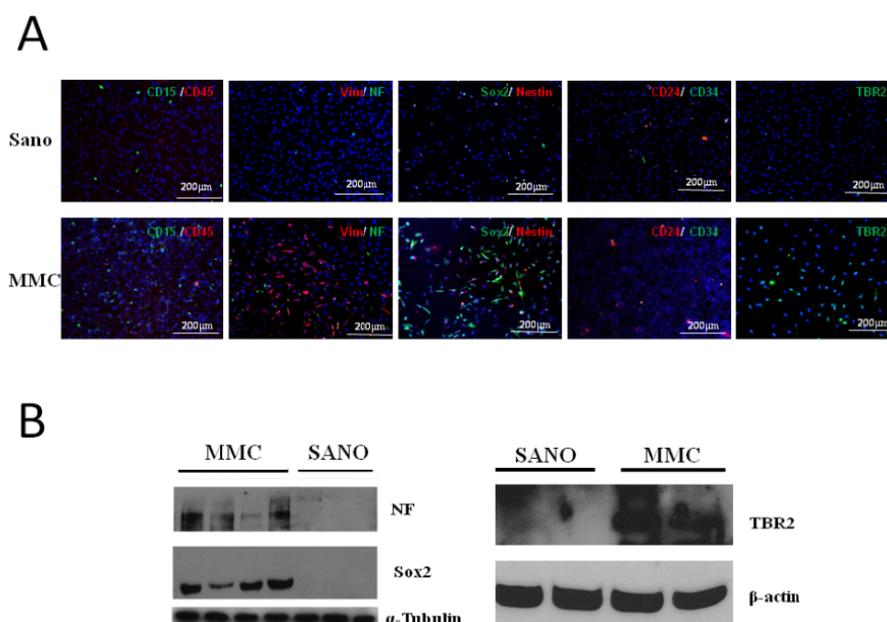


Figura 34- ICF de marcadores de células progenitoras neurales en el LA de origen ovino (A) y análisis mediante WB de marcadores de pluripotencialidad (B).

Por otro lado, se determinó mediante WB la expresión de los marcadores de pluripotencialidad y estirpe neural Sox2, neurofilamento y TBR2. Tal y como se observa en la Figura 34B se detectó una clara expresión del

marcador de pluripotencialidad y linaje neural Sox2, y de los marcadores de progenitores neurales (TBR2) y estirpe neural (neurofilamento) exclusivamente en células aisladas a partir de LAs de MMC, mientras que ninguno de estos tres marcadores se encontraron en células provenientes del cultivo de los LAs sanos.

## **2.2. LA de origen humano**

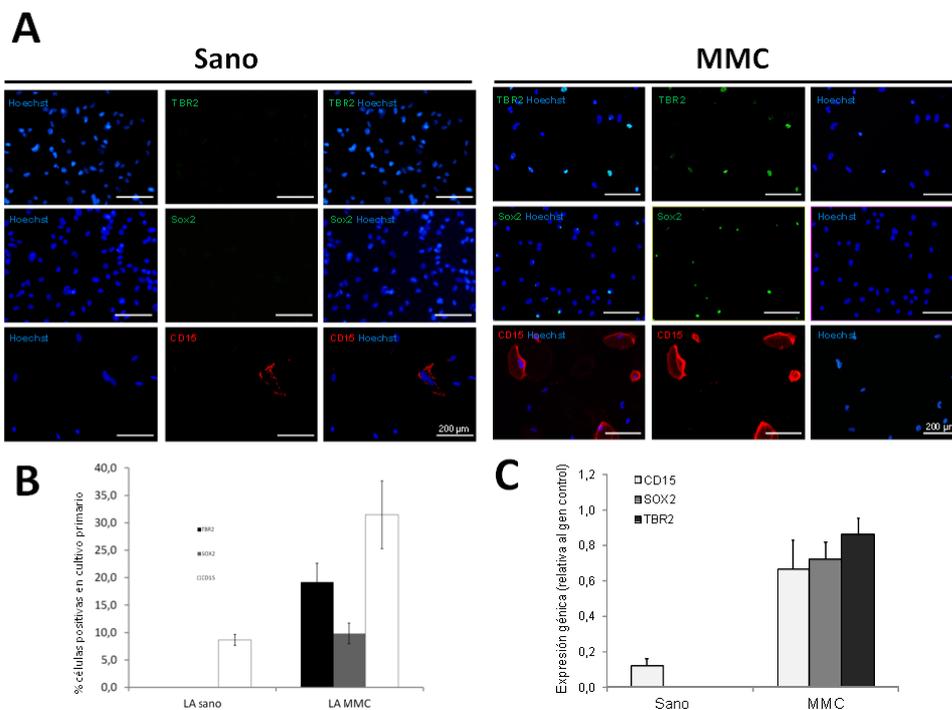
También se determinó la presencia de NPCs en los cultivos primarios de LAs, donde se estudió mediante un análisis de inmunocitofluorescencia por RT-PCR semicuantitativa la expresión de los marcadores específicos de progenitores neurales TBR2 (Hodge, Kowalczyk et al. 2008; Hodge, Nelson et al. 2012), Sox 2 (Tanaka, Kamachi et al. 2004; Wegner and Stolt 2005; Pevny and Nicolis 2010; Wells, Rough et al. 2011) y CD15 (Capela and Temple 2002; Doetsch 2003; Dromard, Guillon et al. 2008).

Como se muestra en la Figura 35A las células obtenidas a partir del cultivo primario del LA de pacientes con MMC presentan expresión de los marcadores específicos neurales TBR2, Sox2 y CD15. El marcaje positivo tanto para TBR2 y Sox2 se encontró exclusivamente en las células obtenidas del cultivo de LA de pacientes con MMC, presentando, respectivamente, porcentajes de células positivas para TBR2 y Sox2 de  $19.2\pm 3.4\%$  y  $9.8\pm 1.9\%$  respecto al número total de células. En cambio, no se encontraron células positivas para estos marcadores en la población obtenida del cultivo de LA de fetos sanos (Figura 35B).

Por otro lado, el marcador CD15 se detectó tanto en células provenientes de cultivo celular de LAs obtenidos de fetos sanos como de fetos con MMC abierto, aunque el número de células positivas en las muestras de pacientes con MMC fue casi 4 veces superior, mostrando porcentajes de  $8.7\pm 1.1\%$  y  $31.5\pm 6.2\%$  de células positivas para CD15 en pacientes sanos y afectados de MMC, respectivamente, lo que confirma la presencia de células con características de NPCs en el LA de pacientes con MMC.

El análisis por RT-PCR semicuantitativa corroboró los datos obtenidos por inmunocitofluorescencia y demostró la presencia de progenitores neurales exclusivamente en células cultivadas a partir de muestras de LA de pacientes con MMC (Figura 35C). Los valores obtenidos en la cantidad de mRNA de los genes TBR2, Sox2 en las células derivadas del cultivo de LA de pacientes con MMC fue de  $0.86\pm 0.10$  y  $0.72\pm 0.09$  (unidades de expresión relativas en relación a la

cantidad del mRNA para el gen control GAPDH), respectivamente. La expresión de estos dos marcadores en las células del LA de pacientes sanos fue indetectable. La expresión del marcador CD15, al igual que ocurrió en el análisis mediante inmunocitofluorescencia, se detectó tanto en pacientes de MMC como en fetos sanos aunque la expresión de mRNA de CD15 fue casi siete veces superior en las células de pacientes con MMC ( $0.66 \pm 0.16$  y  $0.12 \pm 0.04$  de mRNA de CD15 vs la cantidad de mRNA del gen control).



**Figura 35-** Inmunocitofluorescencia del LAs humanos para marcadores neurales específicos (A), porcentajes de células positivas para estos marcadores (B) y análisis de los datos obtenidos para la presencia de los marcadores de progenitores neurales por RT-PCR semicuantitativa (C)

Nuestros resultados demuestran la presencia de una subpoblación celular en los LAs de pacientes con MMC que reúnen características de progenitores neurales.

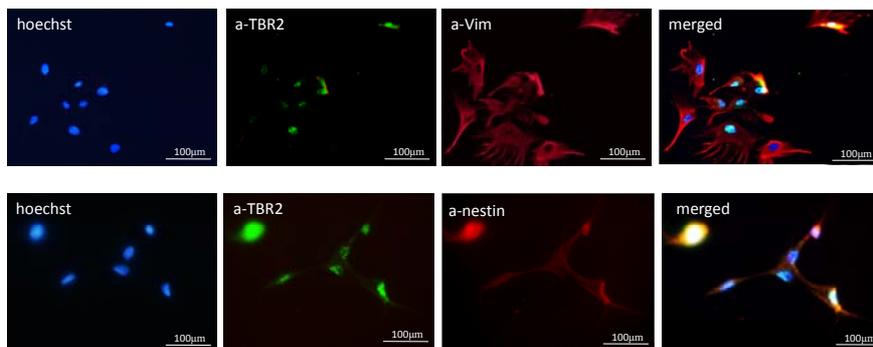
### 3. Análisis del LCF

Una vez demostrada la presencia de progenitores neurales en muestras de LA de fetos con MMC se procedió a evaluar la presencia de NPCs en LCF, en base a nuestra hipótesis de que el origen de células precursoras neurales en muestras de LA de fetos con MMC se debe a la pérdida del LCF a través del defecto de tubo neural y la pérdida continua de LCF hacia el espacio amniótico.

#### 3.1. LCF de origen fetal de oveja

Una vez establecido el cultivo primario de LCF de oveja se procedió a realizar el análisis de la presencia de NPCs mediante inmunocitofluorescencia y analizando marcadores específicos de progenitores neurales.

Como se observa en la Figura 36, en las células obtenidas a partir del LCF extraído del canal medular o de la cisterna magna de oveja se pudo observar un marcaje positivo para los marcadores de progenitores neurales Nestin, TBR2, neurofilamento y vimentina.



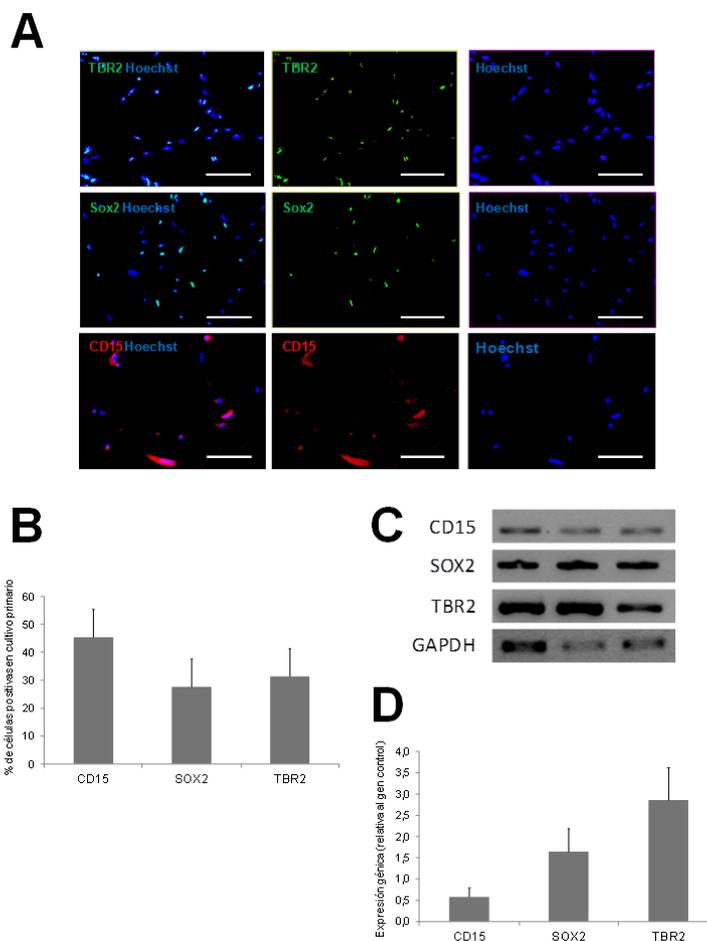
**Figura 36-** Marcadores de progenitores neurales en LCF de feto de oveja en cultivo primario en proliferación

#### 3.2. LCF de origen humano

Tras haberse establecido con éxito el cultivo de LCF de origen humano, se evaluó la presencia de NPCs a través del estudio de la expresión de marcadores neurales y de pluripotencialidad como el TBR2, el Sox2 y el CD15, mediante un análisis de inmunocitofluorescencia y RT-PCR semicuantitativa.

Las células del LCF mostraron una clara expresión de los tres marcadores específicos neurales como se puede observar en la Figura 37A. Se analizó el porcentaje de células positivas para estos marcadores en los cultivos celulares que fueron  $45.4 \pm 5.4\%$ ,  $27.6 \pm 7.8\%$  y  $31.3 \pm 4.2\%$  para CD15, Sox2 y TBR2, respectivamente (Figura 37B).

El análisis mediante RT-PCR corroboró la expresión de TBR2, Sox2 y CD15 en células derivadas del LCF, mostrando unos niveles de mRNA en relación al gen control GAPDH de  $0.58 \pm 0.21$ ,  $1.65 \pm 0.53$  y  $2.86 \pm 0.76$  para los genes CD15, Sox2 y TBR2, respectivamente (Figura 37C y D). Estos resultados demuestran la presencia de una población celular en el LCF humano que posee características de progenitores neurales.



**Figura 37-** Inmunocitofluorescencia para marcadores específicos neurales en LCF de origen humano (A), porcentaje de células positivas para los mismos (B), análisis por RT-PCR para esos marcadores respecto al gen control GAPDH (C y D)

## 4. Diferenciación celular en cultivo

En este apartado nos centramos en el estudio de muestras humanas para evaluar su estado indiferenciado en el proceso de obtención y expansión en cultivo primario, así como su capacidad de diferenciarse a diferentes linajes de estirpe neural.

### 4.1. NPCs presentes en LA

#### 4.1.1. Marcadores de diferenciación neural LA humano

Para confirmar el estadio no-diferenciado de las células cultivadas a partir de LAs tanto de pacientes sanos como de fetos afectados por MMC, se analizó la presencia de marcadores de diferenciación neural en las células de LA en cultivo en proliferación. Como se puede observar en la Figura 38, el análisis mediante inmunocitofluorescencia para evaluar la presencia de marcadores específicos de células diferenciadas de los linajes neurales, como  $\beta$ III-tubulina para las neuronas, GFAP para astrocitos y Oligo- O1 para oligodendrocitos, demostró que las células de LA en proliferación no presentan expresión de ninguno de los marcadores de células diferenciadas, independientemente de que procedan de LAs de fetos sanos o de MMC, lo que corroboró que las células presentes en el LA y en el cultivo primario en crecimiento permanecen en estado indiferenciado en las muestras de LA y durante el proceso de expansión en cultivo celular.

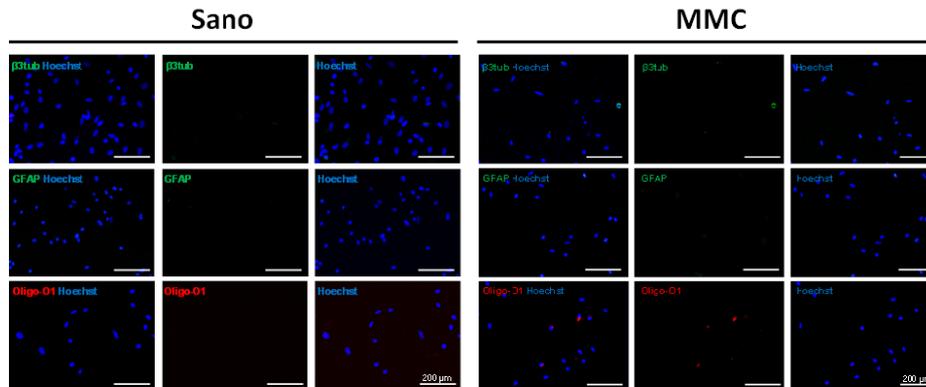


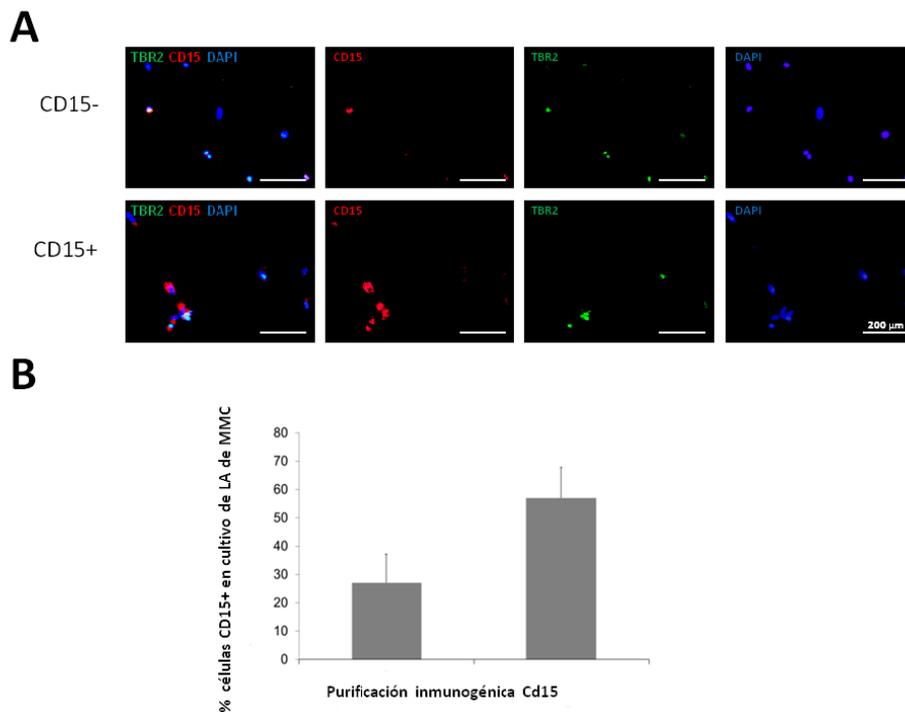
Figura 38- ICF de marcadores específicos de diferenciación neural en LA humano en proliferación

#### 4.1.2. Purificación de NPCs del LA humano con MMC

En base a una posible estrategia terapéutica futura dirigida al aislamiento de NPCs a partir de muestras de LA de pacientes con MMC y el posterior trasplante autólogo en la zona de la médula lesionada de células con propiedades de regeneración de tejido neural en estos pacientes, se procedió al estudio de la capacidad de purificación/enriquecimiento de esta subpoblación celular mediante columnas de afinidad inmunomagnética, en base a la presencia del marcador de superficie CD15 el cual se haya presente en células progenitoras neurales.

La purificación inmunomagnética de las células CD15 positivas se realizó con células en cultivo primario obtenidas a partir de los LAs de pacientes con MMC, las cuales tras la incubación con un anticuerpo específico dirigido contra CD15 humano y unido a una partícula magnética, se pasaron a través de columnas de afinidad magnética comerciales (*Mini MACS purification system*, Milteny BioTec) de forma que las células CD15+ quedaron retenidas en la columna. Tras el procedimiento y la expansión en cultivo por separado de ambas poblaciones hasta una confluencia del 40-50% se realizó un análisis mediante inmunocitofluorescencia para determinar el número de células que expresaban el marcador CD15, en ambas fracciones obtenidas tras la purificación, la fracción CD15+ y la fracción CD15-. Como era esperable, el marcaje celular en la fracción CD15+ fue mucho mayor que en la fracción CD15- tras la purificación celular (Figura 39A).

Con el fin de determinar la efectividad del proceso de purificación celular, se cuantificó el porcentaje de células positivas de CD15 en el cultivo celular antes y después de la purificación inmunomagnética para CD15. El resultado del conteo de células CD15+ antes y después de la purificación demostró que el cultivo celular se enriqueció en un 54% tras la purificación inmunomagnética, incrementando desde  $31.5 \pm 6.2\%$  hasta un  $48.5 \pm 11.4\%$  la cantidad de células CD15+ respecto al número total de células en el cultivo (Figura 39B).

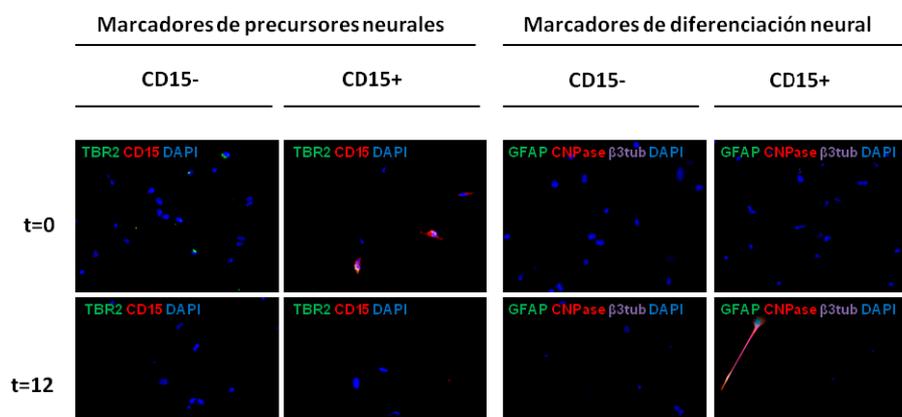


**Figura 39-** ICF de marcadores de NPCs en células CD15+ y - tras la purificación a partir de LA de pacientes con MMC

#### 4.1.3. Diferenciación *in vitro* de NPCs purificadas

Con el objetivo de evaluar la capacidad de las NPCs derivadas de los LAs de diferenciarse hacia los diferentes linajes neurales, las NPCs CD15 positivas obtenidas mediante purificación inmunomagnética se sometieron a la inducción de la diferenciación *in vitro* hacia células de linaje neural mediante la privación de factores de crecimiento en el medio de cultivo. De esta manera, tal y como se puede observar en la Figura 40 el análisis realizado por inmunocitofluorescencia antes y después de la diferenciación celular demuestra que antes de la inducción de la diferenciación (tiempo 0) las NPCs positivas para CD15 presentaban la clara presencia de los marcadores de NPCs CD15 y TBR2, pero no expresaban marcadores específicos de diferenciación y, en cambio, tras 12 días de diferenciación se detectó una clara presencia de los marcadores específicos de células neurales diferenciadas exclusivamente en los cultivos de células CD15+, desapareciendo a su vez los marcadores de pluripotencialidad y

precursores neurales observados en células en proliferación en el paso previo a la diferenciación.



**Figura 40-** Marcadores específicos de progenitores neurales y de diferenciación neural de las NPCs purificadas de LAs de MMC antes y después de diferenciarlas con medios específicos

## 4.2. NPCs derivadas de LCF

### 4.2.1. Diferenciación aleatoria de las NPCs *in vitro*

Las NPCs obtenidas a partir de muestras de LCF se indujeron a la diferenciación hacia los distintos linajes neurales mediante la privación de factores de crecimiento. Los cultivos primarios, al alcanzar una confluencia entre el 40-50%, se incubaron durante 10 días con el medio *StemPro® NSC SFM* en ausencia de factores de crecimiento. En estas condiciones las NPCs derivadas del LCF mostraron una elevada capacidad de diferenciarse arbitrariamente hacia los distintos linajes celulares neurales, como neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

Mediante la privación de factores de crecimiento se observó que las NPCs derivadas del LCF tienen una elevada capacidad de diferenciarse hacia células del linaje neural como neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Esto se demostró en base a la detección de marcadores específicos para neurona ( $\beta$ -III tubulina), astrocito (GFAP) oligodendrocito (CNPase y Oligo-O1) tras el análisis por inmunocitofluorescencia triple, tanto en muestras de LCF del modelo de oveja (Figura 41) como en células procedentes de LCF humano (Figura 42).

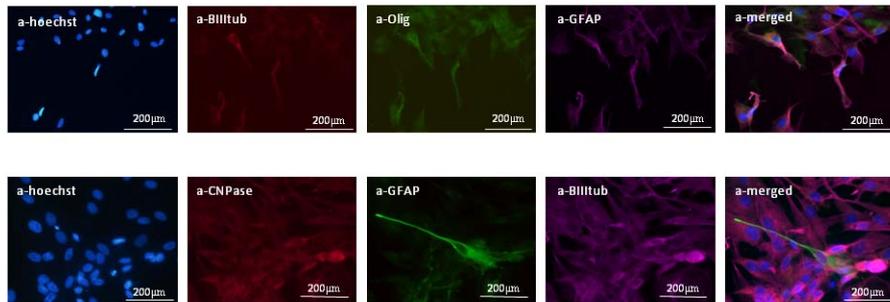


Figura 41- ICF de LCF de oveja con marcadores específicos de los tres linajes neurales cuando se indujeron a la diferenciación mediante la privación de factores de crecimiento

Tras el periodo de diferenciación se observaron además importantes cambios morfológicos, dado que las células mostraron morfología del tipo neural con protuberancias alargadas y neuritas y también formas redondeadas con gran citoplasma a modo de precursores astrocíticos (Figura 42).

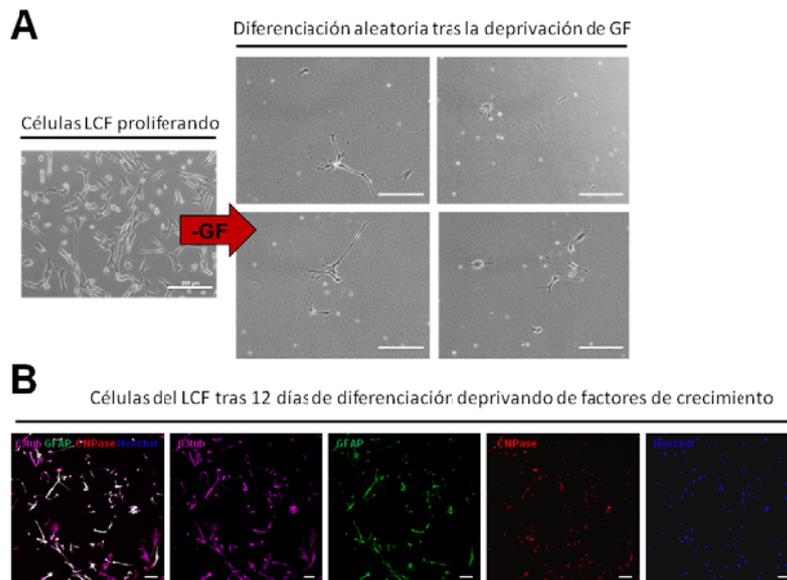


Figura 42- Morfología de las células del LCF humano al diferenciarse mediante la privación de factores de crecimiento (A) y marcadores específicos analizados mediante ICF en las células de LCF diferenciadas

Los niveles de expresión de los genes marcadores de la diferenciación neuronal y glial se cuantificaron mediante los niveles de fluorescencia con el

programa *Image J* y los valores obtenidos demostraron un claro aumento de su expresión tras 10 días de diferenciación por privación de factores de crecimiento (Figura 44A). Así, tras la diferenciación aleatoria de las NPCs derivadas de LCF se observó un incremento de 4 veces en la expresión del marcador neuronal  $\beta$ III-tubulina ( $p=0,0054$ ), 6,7 veces de incremento del marcador de astrocitos GFAP ( $p=0,023$ ) y 8,6 veces de aumento en los niveles del marcador de oligodendrocitos oligo-O1 ( $p=0,0019$ ), en comparación con células de LCF en proliferación previamente a la inducción de la diferenciación.

#### **4.2.2. Diferenciación *in vitro* específica de NPCs**

Para evaluar el potencial de las NPCs derivadas del LCF de diferenciarse específicamente a neuronas, astrocitos u oligodendrocitos, éstas se incubaron durante 10 días con medios específicos de diferenciación hacia los diferentes linajes neurales. De esta manera, las NPCs se indujeron a diferenciar de forma específica a los distintos linajes neurales mediante la utilización de medios de cultivo de diferenciación neuronal, astrocítico u oligodendrocítico (Life Technologies, USA) durante 10 días y se demostró su habilidad de diferenciarse específicamente hacia los tres linajes neurales.

Tras el periodo de diferenciación se observaron importantes cambios morfológicos específicos en las células diferenciadas, los cuales incluyeron la adquisición de forma de huso alargado con crecimiento de protuberancias neurales y/o neuritas en las células derivadas hacia linaje neuronal y oligodendrocitos, y, en cambio, se observó una morfología redondeada con engrosamiento del citoplasma en las células derivadas hacia astrocitos (Figura 43).

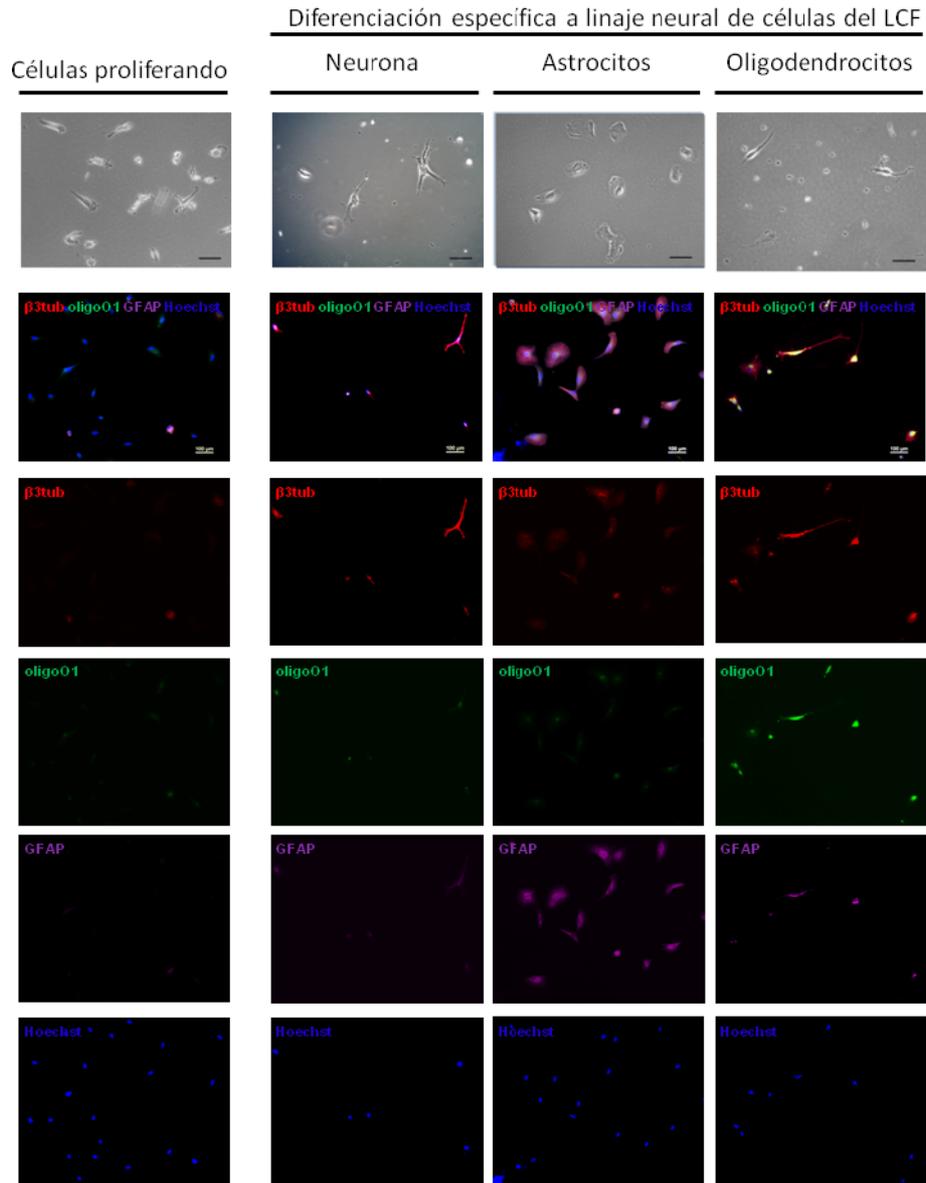
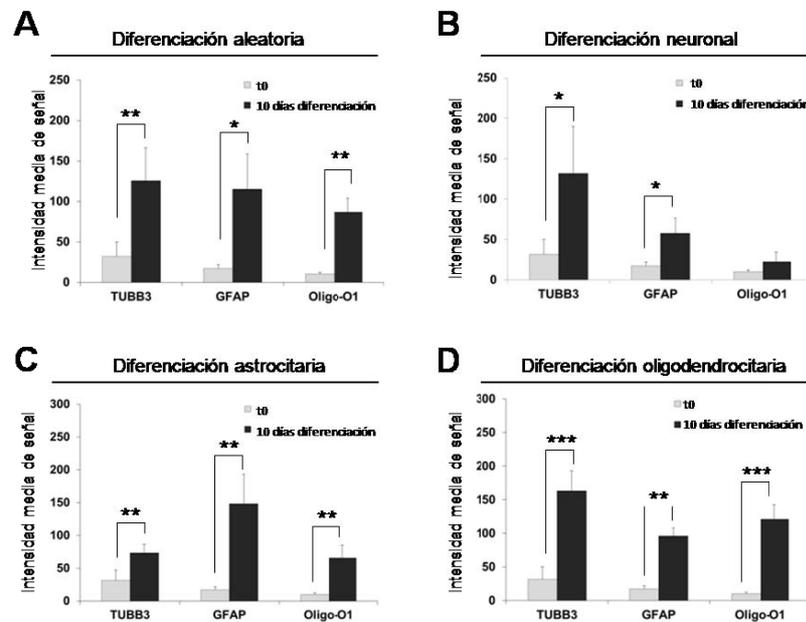


Figura 43- Morfología y análisis por ICF de las NPCs derivadas de LCF con marcadores específicos de diferenciación

El análisis por inmunocitofluorescencia de la expresión de los marcadores específicos de diferenciación para cada linaje neural demostró que las NPCs de LCF humano se pueden diferenciar específicamente hacia los diferentes tipos celulares neurales, con un importante aumento en la expresión de cada marcador específico correspondiente a su tipo de diferenciación (Figura 44)



**Figura 44-** Gráficas representativas de la variación en la expresión de marcadores específicos de diferenciación de las NPCs procedentes del LCF.

De esta manera, se cuantificó la expresión de los marcadores específicos de diferenciación y se observó que tras la diferenciación hacia neuronas las células presentaron un incremento de 4,3 veces del marcador específico  $\beta$ III- tubulina comparándolo con NPCs previamente a la diferenciación, además de un aumento de 3,3 veces ( $p=0,048$ ) en la expresión del marcador de astrocitos GFAP (Figura 44B).

En cuanto a la diferenciación específica hacia astrocitos, ésta indujo un incremento en la expresión del marcador GFAP en 8,7 veces (Figura 44C) respecto a las células no diferenciadas ( $p=0,0022$ ) aunque también se detectaron incrementos en menor medida en la expresión de los marcadores específicos  $\beta$ III- tubulina (2,3 veces,  $p=0,0017$ ) y Oligo- O1 (6,5 veces,  $p=0,0057$ ) para neurona y oligodendrocitos, respectivamente.

Con respecto a la diferenciación específica hacia oligodendrocitos, las NPCs mostraron un fuerte aumento en el marcador específico Oligo-O1 de 12,1 veces ( $p=2.0 \times 10^{-4}$ ), aunque también se detectaron incrementos de 5,2 veces en el marcador  $\beta$ III-tubulina ( $p=2,5 \times 10^{-5}$ ) y de 5.3 veces en el marcador GFAP ( $p=0,0017$ ) tal y como se puede observar en la Figura 44D.

## 5. Modelo de MMC en conejo

Una vez optimizado el proceso de obtención de las células progenitoras neurales que son aquellas idóneas para la regeneración neural de los tejidos afectados por la lesión de MMC fue necesario comenzar las pruebas de trasplante celular. Para las mismas y, pese a que nuestro grupo tenía optimizado la lesión de MMC en modelo de oveja, se escogió el modelo de MMC en conejo dado que la manipulación de sus fetos es mucho más sencilla, además de que tiene un corto tiempo de gestación, lo que permite obtener resultados de manera rápida y, además, por cada gestación el conejo tiene una media de 6-8 fetos lo que posibilita realizar muchas pruebas diferentes a la vez y, por consecuencia, disminuye los gastos económicos asociados.

El procedimiento quirúrgico que se utilizó para el proceso de creación de la lesión de MMC en el modelo experimental de feto de conejo se puede observar en la Figura 45.

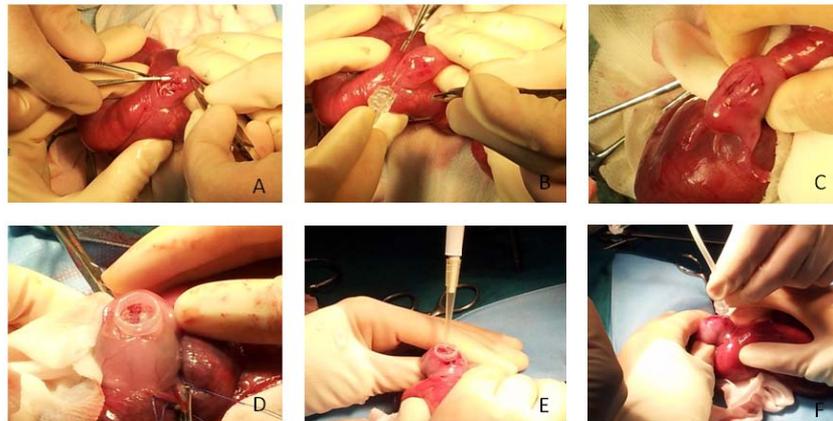


Figura 45- Modelo de lesión quirúrgica y química de MMC en conejo

Los pasos que se realizaron en este tipo de intervención en modelo de lagomorfo son, en primer lugar, la realización de una laminectomía (Figura 45A), tras lo cual se extrajeron los músculos paravertebrales de la zona lumbar del

feto, seguida de la apertura de la duramadre mediante la sección longitudinal con el filo de una aguja quirúrgica de 27G (Figura 45B) consiguiendo así la exposición de la médula espinal (Figura 45C).

Este fue el modelo de lesión quirúrgica del MMC en el conejo, sin embargo, dado que también se quería llegar a causar un daño similar al que la médula espinal acumula durante la gestación en el caso del MMC humano se añadió un componente de lesión química, de manera que la médula espinal ya expuesta se puso en contacto con un detergente que provoca una abrasión celular (Figura 45D y E), posteriormente, la lesión se lavó con suero fisiológico (Figura 45F) antes de reintroducir al feto en la bolsa amniótica. Este proceso permite imitar la lesión humana que se produce en la médula espinal al quedar expuesta al ambiente uterino y entrar en contacto con el líquido amniótico.

### **5.1. Optimización de lesión medular en conejo para imitar la lesión en MMC humano**

Con el fin de optimizar la lesión producida en la médula espinal de los fetos de conejo que reprodujese fielmente a aquella que se produce por la continua exposición del tejido neural al ambiente uterino y por su interacción química con el líquido amniótico e interacción mecánica con las paredes de la bolsa amniótica en los fetos humanos, se realizaron pruebas con diferentes concentraciones del detergente utilizado y a diferentes tiempos de exposición, tal y como se resumen en la Tabla 5.

Sobre las tinciones histológicas realizadas en las zonas lumbares de los fetos de conejo, que se pueden observar en la Figura 46 y con el apoyo del software informático *ImageJ* se midieron los cambios en la relación entre la materia gris (MG) y blanca (MB) presentes en la médula, con el fin de evaluar la pérdida del tejido neural.

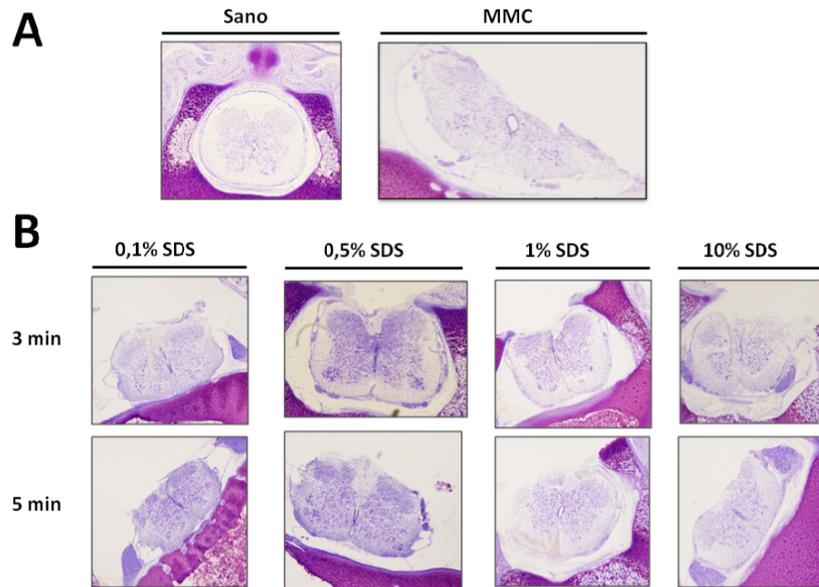


Figura 46-Tinciones Nissl de las médulas de fetos de conejo tratadas en las distintas condiciones

Estos resultados se compararon con la relación MG/MB de médulas sanas y con el daño medular en fetos con MMC generado tras la evolución de la malformación hasta el final de la gestación (Bellenberg, Schneider et al. 2015; Henke, Gorgas et al. 2016). De esta manera se buscaron las condiciones óptimas de utilización del detergente para llegar a un daño medular similar al que se obtiene cuando la lesión de MMC se deja evolucionar hasta el final de la gestación (como ocurre en los humanos).

Según las tinciones histológicas reflejadas en la Figura 46 el daño medular más parecido al del MMC dejado evolucionar se conseguiría con la utilización del SDS al 10% aplicándolo durante 5 minutos sobre la médula espinal expuesta (Stottmann, Moran et al. 2011; Zhao, Gan et al. 2014).

Con estas condiciones de detergente utilizado sobre la médula expuesta para conseguir la lesión aguda del MMC, no sólo se consigue la similitud morfológica con las médulas expuestas y dejadas evolucionar; sino que, también se consigue un daño medular similar. Éste se cuantificó mediante el análisis del ratio entre la materia gris/materia blanca en la médula espinal, comparando las médulas sanas, los diferentes tratamientos por exposición al químico y las

médulas de los fetos a los que se les indujo el defecto quirúrgicamente y después se dejaron evolucionar hasta el final de la gestación; en la Figura 47A, se recogen los datos numéricos obtenidos de esta medición y en la Figura 47B se representan estos datos de manera gráfica. Se puede corroborar que el daño medular causado es similar entre el MMC inducido quirúrgicamente y dejado evolucionar y la lesión de MMC aguda con la utilización del detergente cuando éste se utiliza a concentración del 10% y se deja actuar durante 5 minutos.

**A**

	Media área gris	Media área blanca	Ratio G/B
SANO	56,122	43,878	1,585
MMC evolucionado	44,502	55,498	0,731
SDS 0,1% 3min	52,990	47,010	1,199
SDS 0,1% 5min	52,855	47,145	1,137
SDS 0,5% 3min	52,266	47,734	1,131
SDS 0,5% 5min	46,314	53,686	0,806
SDS 1% 3min	50,928	49,072	1,046
SDS 1% 5min	44,118	55,882	0,799
SDS 10% 3min	46,995	53,005	0,788
SDS 10% 5min	46,869	53,131	0,756

**B**

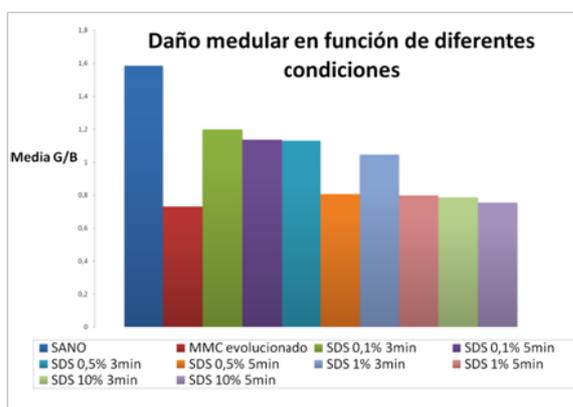


Figura 47- Tabla de las mediciones de las áreas grises y blancas en función de las condiciones utilizadas (A). Gráfico representativo del daño medular causado en relación a las condiciones utilizadas en cada uno de los casos y en comparación con una médula sana (azul) y una lesión de MMC dejada evolucionar (rojo)

## **5.2. Optimización del *scaffold* para las cells NPCs humanas**

Las células escogidas para el trasplante celular deben colocarse en algún tipo de vehículo que les permita mantenerse en el lugar de la lesión pero, a su vez, este *scaffold* debe posibilitar no sólo la viabilidad celular sino también su migración para poder colonizar los tejidos que rodean la zona neural lesionada (Kaviani, Guleserian et al. 2003; Skop, Calderon et al. 2016).

Tras la realización de diferentes pruebas con *scaffolds* compuestos de distintos elementos y en distintas concentraciones, observamos que el que permitía una mayor viabilidad celular y una migración de las células progenitoras neurales desde el interior del *scaffold* hacia los tejidos colindantes era un vehículo formado a partir del propio medio de cultivo donde crecían las células (*DMEM with high glucose* +antibiótico/antimicótico) y plasma humano que tras homogeneizarlo por pipeteo se gelificaba después de mantenerlo 30 minutos a temperatura ambiente.

## **5.3. Trasplante celular en modelo de MMC en conejo**

Una vez se hubieron optimizado las condiciones para la creación de la lesión, se repitió el mismo modelo descrito anteriormente pero, ahora, a los fetos de conejo se les trató con células humanas de LCF, con el fin de evaluar la capacidad de las NPCs de ser trasplantadas *in vivo* sobre la médula espinal dañada.

Las NPCs aisladas a partir de LCF humano se transfectaron con un virus que expresaba la proteína fluorescente roja RFP (*Red Fluorescent Protein*) lo que nos permitiría localizarlas una vez introducidas en la lesión de MMC (Figura 48). Para el proceso de la transfección se utilizó el virus integrativo (*LScC-RFP-W*) que se diluyó hasta una concentración de 10 m.o.i en medio de cultivo *DMEM with high glucose* y antibiótico/antimicótico 1x; las células de LCF se infectaron durante 24 horas y posteriormente, tras la retirada del medio de cultivo que contenía el virus se dejaron proliferar hasta alcanzar una confluencia del 70-80%, además, bajo control microscópico se corroboró que estas células expresaban el transgen rojo durante 2-3 semanas post-infección.

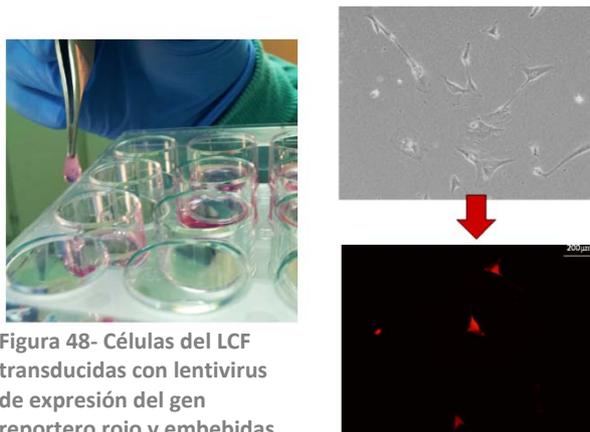


Figura 48- Células del LCF transducidas con lentivirus de expresión del gen reportero rojo y embebidas en el scaffold

Para la realización del trasplante celular en modelo de MMC en conejo, se repitió el proceso quirúrgico, realizado a los 23 días de gestación del conejo, y tras tener la médula expuesta se aplicó el detergente a la concentración y durante el tiempo concluido en las pruebas realizadas anteriormente, es decir, se aplicó SDS al 10% durante 5 minutos. Pasado este tiempo, la lesión del MMC se lavó abundantemente con suero salino antes de colocar el *scaffold* con las células transfectadas, tras lo cual se depositó sobre ella el *scaffold* colonizado con las células del LCF marcadas fluorescentemente (Figura 49E), después se cubrió la zona con una membrana comercial (TissuDura®) que posee características físico-químicas similares a la duramadre. Finalmente, se cerró el defecto con la capa de piel retirada mediante *flap* de la piel por sutura continua con hilo no reabsorbible.

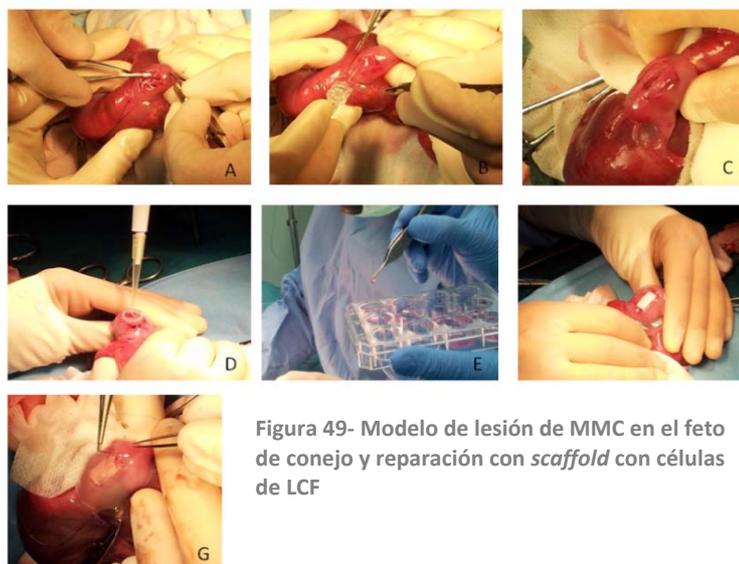
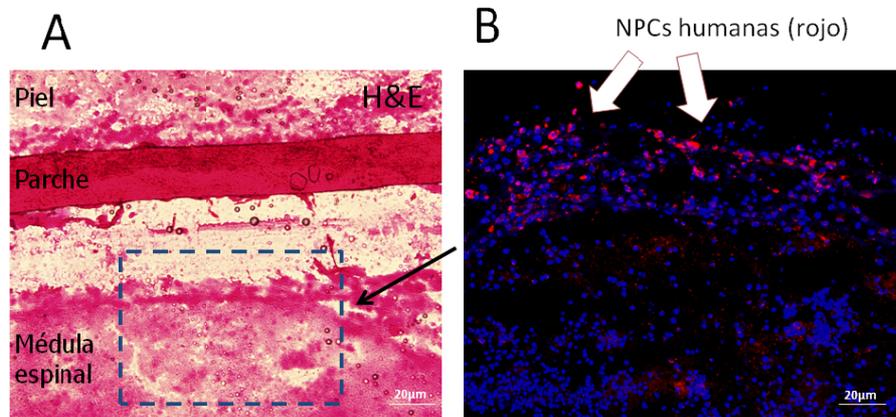


Figura 49- Modelo de lesión de MMC en el feto de conejo y reparación con *scaffold* con células de LCF

Tras el trasplante celular se dejó proceder la gestación a término y se extrajeron los fetos a día 29 (1 día antes de la gestación normal). De esta manera, una semana después del trasplante celular, se practicó una cesárea y se extrajeron las zonas lumbares de los diferentes fetos intervenidos con y sin células. En la Figura 50 se puede observar cómo se detectan las células trasplantadas una semana más tarde del momento de la implantación. La Figura 50A representa una tinción de hematoxilina/eosina de la zona lumbar del conejo lesionado donde se observa la sección transversal de un feto de conejo al que se le realizó el MMC y después se cubrió con el parche y la piel. De esta misma sección, la Figura 50B representa una imagen en el microscopio de fluorescencia donde se observan las células del LCF humano infectadas con el virus que les da el color rojo para poder ser identificadas, integradas en las células de la médula espinal del conejo al que se le había realizado la creación de la lesión y, dado que siguen expresando el virus con el transgen rojo, quiere decir que no hay muerte celular ni rechazo del feto de conejo, pese a que las células utilizadas procedan de LCF humano.



**Figura 50-** Tinción de H&E donde se observa la médula espinal lesionada cubierta por el parche y la piel (A) e imagen de fluorescencia en la que en rojo están las células del LCF humano transfectadas y colocadas en el lugar de la lesión (B)

Estos resultados positivos obtenidos en el modelo de MMC en conejo abren la posibilidad de extrapolar la técnica a un modelo animal superior como paso previo a la utilización de la terapia celular en humanos.

#### 5.4. Trasplante celular en modelo de MMC en oveja

Debido a los resultados positivos obtenidos en el modelo de conejo, donde se consiguió que una semana más tarde las células progenitoras neurales, obtenidas a partir del LCF de humano y transfectadas con un transgen que les proporcionaba fluorescencia roja, siguiesen localizadas en el mismo sitio donde se había realizado la lesión de MMC, se valoró la posibilidad de trasladar esta técnica al modelo de MMC en oveja.

El modelo de MMC ha sido muy utilizado en nuestro grupo y además está ampliamente descrito en la literatura (Meuli, Meuli-Simmen et al. 1995; Fontecha, Peiro et al. 2009; Encinas, Germani et al. 2010; Peiro, Fontecha et al. 2013) así que no hizo falta optimizar el modelo de lesión ya que el realizado por nuestro grupo ya generaba una lesión de MMC similar a la que se produce en los fetos humanos con el defecto congénito.

Tal y como se detalla en el apartado número 10 de la sección de materiales y métodos y se ilustra en la Figura 51, la lesión quirúrgica se creó a día 75 de gestación mediante la resección de la piel, los músculos paravertebrales y la laminectomía de tres vértebras lumbares hasta conseguir la exposición de la médula y la apertura de la duramadre, lo que implicaba la exposición del tejido neural al ambiente uterino. Veinte días más tarde se

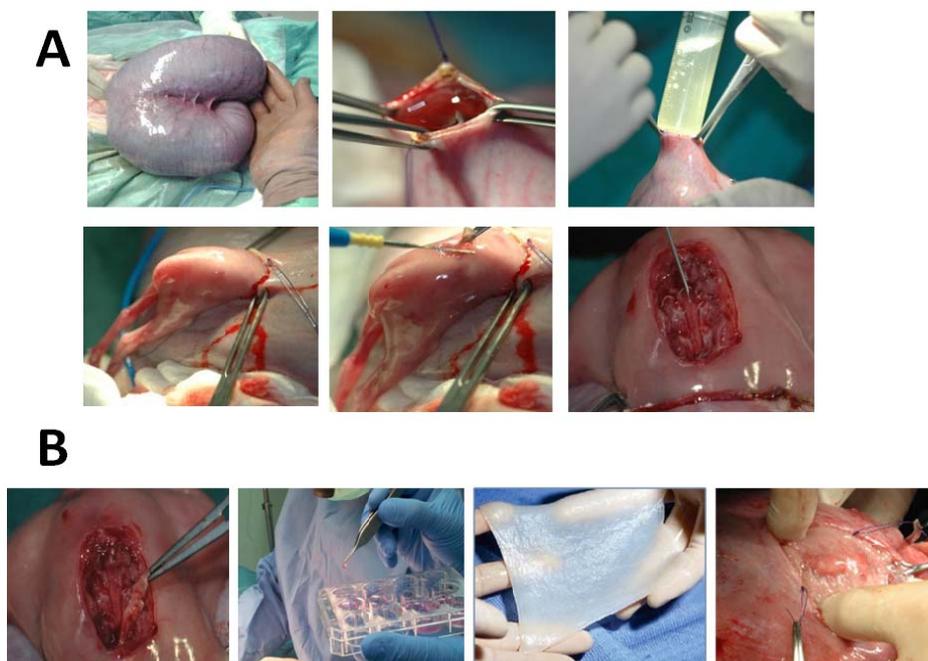
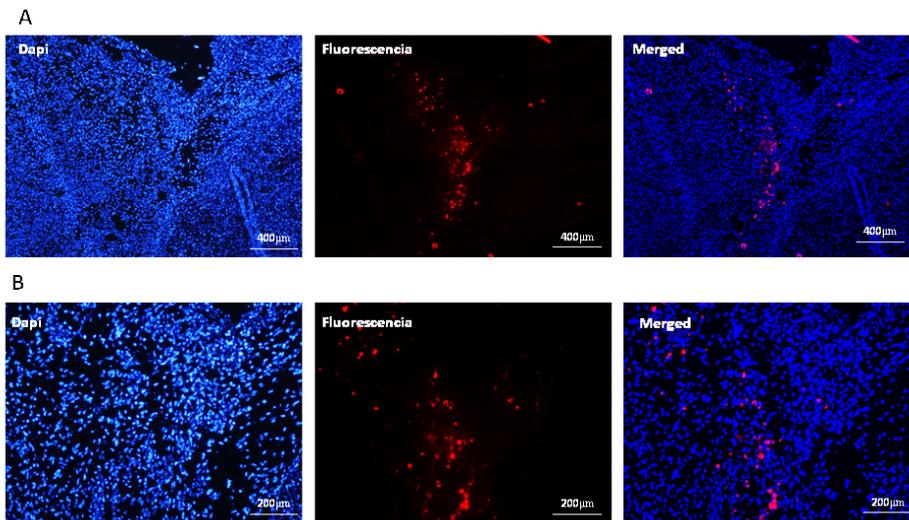


Figura 51- Cirugía de creación del MMC en oveja (A) y de reparación del defecto (B)

procedió a la reparación del defecto de MMC mediante el trasplante celular. Así, la metodología empleada también fue similar a la descrita anteriormente en el caso del trasplante celular en el modelo de conejo.

Las células utilizadas para el modelo ovino también procedían de LCF humano y fueron transfectadas con el mismo virus integrativo (LscC-RFP-W) a una concentración de 10m.o.i. y que expresaba la proteína roja RFP (*Red Fluorescent Protein*) en una infección de 24 horas y que después nos permitiría localizarlas en el lugar de la lesión. La cantidad de células utilizadas fue de 1.000.000 y se embebieron en un *scaffold* igual al utilizado con los conejos (compuesto de medio de cultivo y plasma humano).

La cirugía de reparación del defecto fue similar a la de la creación del mismo pero, en el momento en el que la zona posterior del feto de la oveja quedó expuesta se aplicó el *scaffold* con las células; posteriormente el defecto se cerró con la aplicación sobre el defecto de una membrana comercial de TissuDura® y el cierre se realizó por sutura continua de hilo reabsorbible.



**Figura 52-** Imágenes obtenidas en microscopio de fluorescencia de un feto de oveja con MMC trasplantado con células fluorescentes (rojo) de LCF humano a 40x (A) y 100x (B)

A los 140-145 días de gestación de la oveja se realizó una cesárea para extraer los fetos, las zonas lumbares se congelaron en OCT y después se analizó la presencia de las células trasplantadas y, como refleja la Figura 52, se puede observar que las células que expresan el transgen rojo continúan un mes más

tarde del momento del trasplante en el lugar de la lesión y que además siguen vivas y no se ha producido rechazo por parte del sistema inmune del cordero.



## **Discusión**



## 1. Malformaciones congénitas y defectos del tubo neural: La Espina bífida

Los defectos en el tubo neural (NTDs) son anomalías congénitas del sistema nervioso central, basadas en un defecto en el cierre de diferentes estructuras óseas y tejidos blandos que se pueden producir en el cerebro, la médula y la columna vertebral. Junto a las cardiopatías y los defectos genito-uritarios, se encuentran entre las malformaciones congénitas más frecuentes con una incidencia de 3-4 casos cada 10000 nacimientos (Dolk, Loane et al. 2010). Existen diferentes tipos de NTD, clasificados en función de si hay pérdida o no de líquido cefalorraquídeo (LCF), es decir, en base a si se trata de una lesión abierta o cerrada, y según el tipo de NTD se establece también la gravedad de la enfermedad (Copp and Greene 2013). Las dos formas más comunes de NTDs en la clínica humana son la espina bífida y la anencefalopatía. Ambas malformaciones suelen producirse normalmente entre los días 21 y 28 de desarrollo ((Botto, Moore et al. 1999) y, aunque se desconocen las causas exactas del desarrollo de este tipo de malformaciones congénitas se sospecha que se deben a una casuística multifactorial entre las que se encuentran factores genéticos y ambientales (Copp and Greene 2013; Puvirajesinghe and Borg 2015).

La espina bífida es uno de los NTDs más frecuentes y devastadores que se detectan en el feto humano. A pesar de ser compatible con la vida, la espina bífida provoca graves secuelas y una elevada morbilidad tras el nacimiento, derivando en un progresivo deterioro neurológico y motor por debajo del nivel donde se localiza el defecto, que se acompaña con la pérdida de sensibilidad, problemas locomotores y sensoriales, incontinencia de esfínteres a nivel urinario y/o intestinal, malformación de Chiari II, disfunciones sexuales e incluso paraplejía parcial o completa de las extremidades inferiores. Otras condiciones asociadas a la espina bífida incluyen la hidrocefalia, cuyo tratamiento requiere una derivación del fluido cerebroespinal a través de una sonda intracraneal, además de deformidades vertebrales y desórdenes genitourinarios y gastrointestinales (Fontecha, Aguire et al. 2010).

## 2. El Mielomeningocele

El mielomeningocele (MMC) o espina bífida *aperta* es la forma más severa en la que se presenta la espina bífida en humanos, presentando una incidencia de 1 caso de cada 2000 nacimientos. Su detección mediante

exploración ecográfica a partir de la semana 16-18 de gestación (Adzick 2010; Adzick, Thom et al. 2011) confirma el defecto congénito y la ausencia de tejido óseo vertebral, músculo y piel en la zona del defecto. El MMC provoca la exposición de la médula espinal al ambiente intrauterino y un efecto tanto de erosión mecánica, al rozar con las paredes del saco amniótico, como química, al estar en contacto con el líquido amniótico (LA). De esta manera, el daño sobre el tejido neural va aumentando de forma progresiva a medida que avanza la gestación, sufriendo incluso una lesión adicional en el momento del parto, cuando el feto debe atravesar el canal vaginal (Meuli, Meuli-Simmen et al. 1995; Meuli, Meuli-Simmen et al. 1997; Meuli and Moehrlen 2014).

### **3. Terapias actuales para el tratamiento del Mielomeningocele**

En la actualidad, las alternativas al alcance de los padres a cuyo hijo se le ha diagnosticado un caso de MMC son limitadas. Una de ellas es la interrupción voluntaria del embarazo y otra pasa por realizar una intervención quirúrgica prenatal o postnatal para la corrección del defecto congénito.

Mediante la intervención quirúrgica del cierre del defecto se pretende evitar el daño progresivo del tejido neural que queda expuesto al exterior (Meuli, Meuli-Simmen et al. 1995; Meuli, Meuli-Simmen et al. 1997; Adzick, Sutton et al. 1998; Adzick, Thom et al. 2011). La cirugía prenatal se debe realizar cuando el feto aún se está desarrollando, con el consiguiente riesgo para la madre y el feto, y la alternativa de la cirugía postnatal consiste en una intervención muy agresiva con limitados resultados en la morbi-mortalidad (Johnson, Sutton et al. 2003). En los últimos años, la cirugía prenatal ha ido cogiendo fuerza, demostrando una mejora significativa en la supervivencia y morbilidad de estos pacientes, a la vez que diversos estudios comparativos entre los resultados de la cirugía pre y post natal postulan una clara ventaja de la cirugía prenatal (Adzick, Sutton et al. 1998; Stiefel, Copp et al. 2007; Adzick, Thom et al. 2011).

A pesar de que la cirugía prenatal presenta numerosas ventajas frente a la cirugía postnatal, el daño medular sufrido previamente a la intervención quirúrgica persiste y, por consiguiente estos niños siguen presentando diversas secuelas neurológicas y motoras con las que tendrán que convivir a lo largo de sus vidas. Este hecho refuerza la idea de la necesidad de desarrollar nuevas terapias basadas en la medicina regenerativa y la terapia celular con el objetivo

de regenerar el tejido dañado durante el periodo de la gestación anterior a la cirugía reparadora del cierre del defecto congénito.

#### **4. Terapia celular para la regeneración neural y tratamiento del MMC**

En base a que las presentes alternativas terapéuticas basadas en cirugía no consiguen prevenir o frenar totalmente la lesión del tejido medular ni las secuelas derivadas del MMC, en el presente trabajo nos planteamos el estudio de nuevas aproximaciones terapéuticas basadas en la utilización de células madre o progenitores neurales que permitan reparar el daño neural en los pacientes con MMC y sirvan para revertir la lesión medular sufrida durante la gestación en la fase previa a la intervención quirúrgica prenatal.

De esta manera, una posible estrategia terapéutica basada en la medicina regenerativa y la terapia celular se dirigiría a la regeneración del tejido neural dañado mediante la implantación de células madre con capacidad de regeneración neural en el momento de la intervención quirúrgica prenatal de cierre del defecto congénito. Por tanto, no sólo se conseguiría detener el progresivo daño neural, mediante el cierre quirúrgico y cobertura del defecto lumbar, sino también la regeneración del tejido neural que se ha dañado durante la gestación en el tiempo trascurrido hasta el momento de la cirugía prenatal.

Para ello, la estrategia más idónea de una posible terapia para la reparación del tejido medular dañado implicaría la utilización de células especializadas en formación de tejido neural, como las células madre neurales (NSCs) (Cummings, Uchida et al. 2005; Vishwakarma, Bardia et al. 2014; Doeppner, Traut et al. 2016), o las células progenitoras neurales (NPCs), que son células más diferenciadas hacia el linaje neural y con gran capacidad de generar células específicas del sistema nervioso (Weiss, Reynolds et al. 1996; Reubinoff, Itsykson et al. 2001; Vishwakarma, Bardia et al. 2014). Aunque las NPCs tienen unos ratios de supervivencia y diferenciación más reducidos que las NSCs, se postulan como una interesante herramienta terapéutica para su administración exógena en zonas dañadas del tejido neural debido a sus características de célula madre multipotencial y a su elevada especialización para la generación de células del linaje neural (Florio and Huttner 2014). Las NPCs han sido ensayadas en diversos estudios previos realizados en modelos animales de lesión medular y han demostrado la capacidad de aumentar la supervivencia neural y estimular la

reparación de los tejidos del SNC (Cummings, Uchida et al. 2005; Vishwakarma, Bardia et al. 2014; Doeppner, Traut et al. 2016).

Dado que ha sido descrita la presencia de células precursoras neurales en el LA de pacientes con defectos NTD como la anencefalia (Danzer, Zhang et al. 2011; Maraldi, Bertoni et al. 2014; Chang, Su et al. 2015) y en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con hidrocefalia (Krueger, Wu et al. 2006), se podría postular que las células presentes en el LA de pacientes con NTDs provienen del LCF que se escapa al espacio amniótico a través de la malformación abierta producida por el defecto del tubo neural. Aunque la proporción de NPCs depende de la dinámica del LCF y del tamaño y tipo del defecto, (Pennington, Gray et al. 2013) la pérdida continua de LCF a través del defecto congénito corresponde con una de las características principales del MMC, lo que permitiría el diseño de una estrategia basada en terapia celular autóloga en caso de poder aislar, expandir y trasplantar las NPCs presentes en el LCF obtenidas de muestras de LA o LCF del propio paciente.

Por ello, para el desarrollo de la presente tesis doctoral formulamos una hipótesis que se basa en el aislamiento de las células progenitoras neurales presentes en muestras de líquido amniótico de pacientes con MMC o del LCF contenido en el quiste que recubre el defecto en estos pacientes, con el objetivo de expandirlas en cultivo primario y trasplantarlas a la zona lesionada del defecto neural en modelos animales de MMC para analizar la capacidad de estas células de implantarse en la zona de la lesión medular y regenerar el tejido neural dañado. De esta manera, y con el fin de estudiar, en un futuro próximo, la posibilidad de la terapia celular en la reparación del daño neural, en una primera fase del trabajo nos centramos en la localización y expansión en cultivo celular de precursores neurales presentes en muestras de líquido amniótico de madres gestantes de fetos diagnosticados de espina bífida y de muestras de LCF obtenidas del quiste que recubre el defecto en estos pacientes.

## **5. Células precursoras neurales presentes en el líquido cefalorraquídeo**

Las células con características de progenitores neurales que se encuentran en el líquido amniótico de mujeres gestantes de fetos afectados por espina bífida, pueden proceder del LCF y debido al defecto en el cierre de la zona lumbar se difunden hacia el LA, lo que puede ser avalado por datos obtenidos en diferentes estudios en los que se han encontrado diferencias

estadísticamente significativas en la presencia de NPCs en el LA de fetos afectados por NTDs *versus* LAs de fetos sanos (Pennington, Gray et al. 2013; Turner, Klein et al. 2013; Chang, Su et al. 2015). Las NPCs han demostrado ser células multipotentes con capacidad de auto-renovarse, de expandirse y de diferenciarse *in vitro* hacia células del linaje neural y pueden representar una opción excelente para su uso en nuevas estrategias *in vivo* basadas en la utilización de la terapia celular para la regeneración de lesiones medulares.

En la década de los 90, *Reynolds y Weiss* (Reynolds and Weiss 1992) describieron cómo aislar NSCs a partir de cerebro adulto mediante un sistema conocido como “ensayo de neuroesferas”. Este mismo método para aislar NSCs fue el que se ha utilizado en el presente trabajo para conseguir neuroesferas en cultivo primario. A diferencia del trabajo descrito por *Reynolds y Weiss*, en el presente estudio, las neuroesferas fueron aisladas a partir de muestras de médula espinal tanto de humanos como de ovejas. Tal y como se muestra en la Figura 24 el cultivo de las células aisladas corresponde con las características de las neuroesferas, las cuales crecen en suspensión y a los pocos días comienzan a diferenciarse y a crecer en monocapa, permaneciendo una pequeña parte de las mismas en estadio no diferenciado; esta población celular es conocida como NSCs y está formada principalmente por células progenitoras neurales y un pequeño porcentaje de células madre (Mothe and Tator 2013).

El aislamiento de NSCs y NPCs conseguidas a partir de la médula espinal gracias al protocolo de *Reynolds* corrobora los estudios descritos en la literatura donde se demuestra que tanto en la médula espinal adulta de animales como de humanos existen células madre y progenitoras neurales y que éstas, además de proliferar *in vitro*, son capaces de diferenciarse hacia neuronas y células gliales (Dromard, Guillon et al. 2008; Wells, Rough et al. 2011; Zappaterra and Lehtinen 2012). En estos estudios previos se ha descrito que estas células tienen un elevado potencial neurogénico *in vitro* y se han llegado a establecer como una potente herramienta para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para reparar la lesión de la espina bífida.

El descubrimiento de la existencia en la médula espinal adulta de estas células madre y progenitoras neurales apoyan la teoría de que estas células pueden ser liberadas al LCF que circula a través del canal central. Aunque el origen de las células circulantes en el canal medular puede provenir de diferentes regiones del SNC en mamíferos, como la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales, el giro dentado del hipocampo, el tercer ventrículo, el canal epidural de la médula espinal, o la corteza cerebral, todavía existen

pocos datos sobre la actividad neurogénica en estas regiones y su implicación en el funcionamiento del SNC. Independientemente de su origen, el hecho de la existencia de células con capacidad neurogénica circulantes en el LCF humano, puede proporcionar una fuente de células progenitoras neurales que pueden ser aisladas y expandidas en cultivo con el objetivo de ser utilizadas en abordajes terapéuticos para la reparación del tejido neural mediante trasplante celular autólogo en pacientes con mielomeningocele, generando así una nueva terapia prenatal en estos pacientes.

A pesar de que se han realizado diversos estudios para localizar células con capacidades neurogénicas en la médula espinal adulta, los datos publicados en referencia a la presencia de células pluripotenciales en LCF fetal humano son pocos (Weiss, Dunne et al. 1996; Shihabuddin, Ray et al. 1997; Dromard, Guillon et al. 2008). Cabe destacar, que existe un único estudio previo (Krueger, Wu et al. 2006) donde se establecen cultivos celulares a partir de muestras de LCF humano y se describe la presencia de progenitores neurales en LCF proveniente de pacientes con hidrocefalia, sugiriendo el potencial del LCF fetal como fuente de NPCs.

Por tanto, en este trabajo nos propusimos el establecimiento de cultivos celulares de muestras de LCF humano obtenidas del quiste que recubre la lesión medular en los fetos afectados de MMC, así como el cultivo de muestras de LA de fetos sanos y de fetos con MMC para corroborar la existencia de las NPCs en el espacio amniótico de pacientes con espina bífida *aperta* y pérdida continuada de LCF a través de defecto congénito. Antes de iniciar el estudio de esta población de NPCs en el LCF y en el LA se tuvo que poner a punto el establecimiento del cultivo primario de manera exitosa, lo que implicó que el cultivo celular a partir de las muestras humanas obtenidas mediante el abordaje quirúrgico debía ser en fresco y producirse inmediatamente después de su obtención y en condiciones totalmente estériles, problemas que, como reflejan las Figura 26 y Figura 27 se solventaron de manera satisfactoria. También se consiguió el cultivo de manera independiente de las diferentes poblaciones o clones celulares que se pueden encontrar en las muestras de líquidos amnióticos obtenidos de los pacientes, como se observa en las Figura 28 y Figura 29, lo que puede generar estudios futuros en los que se identifiquen clones específicos de células con linaje neural (Pennington, Gray et al. 2013) y su obtención aislada a partir de la muestra inicial de líquido amniótico, como una posible alternativa a su purificación tras la expansión en cultivo de todas las células presentes en el LA de fetos afectados por MMC (Kaviani, Perry et al. 2001).

### 5.1. Cultivo celular y propiedades neurogénicas de NPCs derivadas de LCF humano

En el presente estudio hemos demostrado la presencia de NPCs en muestras de LCF obtenidas del quiste formado en la lesión de MMC de nuestros pacientes y la capacidad de estas células no sólo de proliferar *in vitro* sino también de diferenciarse en células neuronales y gliales, lo que demuestra su potencial para la regeneración neural en ensayos *in vivo*. En este estudio se utilizaron muestras de LCF tanto del modelo experimental de feto ovino (Figura 30) obtenido del canal medular del feto de oveja, como muestras humanas obtenidas por aspiración del LCF contenido en el quiste que recubre el defecto de MMC durante la intervención quirúrgica de reparación del defecto en pacientes intervenidos en el Hospital Vall d'Hebrón (Figura 32).

Estudios previos han descrito que el LCF contiene factores de crecimiento neurogénicos (Buddensiek, Dressel et al. 2010; Zappaterra and Lehtinen 2012) y un reducido número de células circulantes con propiedades de progenitores neurales (Krueger, Wu et al. 2006). A pesar de que el LCF tiene una celularidad muy baja (de Graaf, de Jongste et al. 2011) a partir de una pequeña cantidad de muestra (1,5-2mL) se consiguió establecer un cultivo primario de LCF y demostrar la capacidad proliferativa de estas células tanto en el caso del modelo experimental ovino como en muestras de origen humano (Figura 31 y Figura 33).

Una vez establecido el cultivo de las células presentes en el LCF, la determinación de la expresión de marcadores específicos de NPCs como TBR2, Sox2, CD15, Vimentina y Nestin, tanto en el LCF obtenido del modelo de oveja como de muestras humanas, corroboraron las propiedades neurogénicas de las células derivadas del LCF obtenido del quiste sobre la lesión en pacientes con MMC (Figura 36 y Figura 37). TBR2 es un reconocido marcador de células progenitoras neuronales y desempeña un papel clave en la progresión de las NSCs hacia los progenitores intermedios y neuronas (Hodge, Kowalczyk et al. 2008; Hodge, Nelson et al. 2012). Sox2 se ha descrito como un marcador de pluripotencia en células madre neurales (Tanaka, Kamachi et al. 2004; Pevny and Nicolis 2010; Wells, Rough et al. 2011) las cuales desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de los progenitores neurales adultos y embrionarios (Wegner and Stolt 2005). CD15 (SSEA-1) no sólo se ha descrito como un marcador de células madre (Capela and Temple 2002; Doetsch 2003), sino que también se expresa en células precursoras neurales inmaduras y en células subependimales y ependimales dorsales (Dromard, Guillon et al. 2008). Nestin

es un conocido marcador de NSCs del que se ha demostrado su presencia en células procedentes del LA de pacientes con NTDs (Pennington, Gray et al. 2013; Hong, Kim et al. 2016). Por último, la vimentina se ha descrito como un marcador asociado a las células progenitoras neurales, lo que implica el estadio indiferenciado e inmaduro de estas células y su potencial capacidad para diferenciarse *in vitro* (Flax, Aurora et al. 1998; Liu, Li et al. 2014; Magistri, Khoury et al. 2016).

Tras el análisis de los niveles de los diferentes marcadores, es importante destacar la presencia de un elevado número de células que presentaban expresión de CD15, Sox2 y TBR2 (45%, 28% y 31%, respectivamente) en los cultivos primarios obtenidos a partir de LCF humano (Figura 37) lo que demuestra la presencia de progenitores neurales en el LCF acumulado en el quiste que recubre el defecto lumbar. Nuestros resultados corroboran datos publicados anteriormente donde se describe la presencia de más del 90% de células Sox2 positivas y alrededor del 65-85% de células positivas CD15 en muestras de médula espinal humana (Dromard, Guillon et al. 2008). La presencia de TBR2, Sox2 y CD15 en células circulantes del LCF sugieren su posible origen por migración desde las capas celulares del canal central de la medula espinal, aunque se requerirían estudios adicionales para poder definir los posibles orígenes de estas células, como ependimal, subependimal y zona subventricular o del plexo coroideo.

## **5.2. Capacidad de diferenciación neuronal y glial de las NPCs derivadas del LCF**

Para confirmar la multipotencialidad de las NPCs derivadas del LCF, analizamos las propiedades neurogénicas, tanto a nivel morfológico como mediante el análisis de la expresión de marcadores específicos de diferenciación neural, de las células en cultivo induciendo la diferenciación hacia los subtipos celulares neuronal y glial. Los marcadores específicos escogidos para los ensayos de diferenciación neural han sido ampliamente descritos en la literatura;  $\beta$ III-tubulina para el marcaje de neuronas, GFAP para astrocitos y oligo-O1 y CNPase para el marcaje de oligodendrocitos (Vishwakarma, Bardia et al. 2014; Bokara, Kim et al. 2016; Tsan, Morell et al. 2016). Basándonos en estos marcadores extensamente utilizados para la demostración de la capacidad neurogénica de células madre o progenitoras neurales con distintos orígenes (Kaviani, Guleserian et al. 2003; Parati, Pozzi et al. 2004; Barnabe-Heider and Frisen 2008; Rosner, Schipany et al. 2012; Sandner, Prang et al. 2012; Li and Lepski 2013;

Mothe and Tator 2013; Sahab Negah, Khaksar et al. 2016) pudimos determinar la capacidad de diferenciación neural de las células obtenidas a partir del LCF humano y corroborar su potencial neurogénico y de especialización hacia células neuronales y gliales.

Con el fin de evaluar su capacidad de diferenciación se realizó una primera aproximación mediante diferenciación arbitraria de células del LCF de oveja (Figura 41) y humanas (Figura 42) por privación de factores de crecimiento en el medio de cultivo. Las células derivadas del LCF fueron capaces de generar un elevado número de células diferenciadas con características morfológicas de estirpe neural (Figura 42A), es decir, una forma alargada y con la aparición de dendritas en el caso de neuronas y oligodendrocitos y, una morfología plana, agrandada y redondeada en el caso de los astrocitos (O'Brien, Keeney et al. 2015; Lins, Wianny et al. 2016; Sanluis-Verdes, Sanluis-Verdes et al. 2016). Estas observaciones en los cambios morfológicos se correspondieron con la expresión de marcadores específicos de células diferenciadas neuronales y gliales analizada mediante ensayos de inmunocitofluorescencia (Figura 41 y Figura 42B) y por expresión génica mediante PCR (Figura 44A).

A continuación, se analizó la capacidad de las células provenientes del LCF de diferenciación específica hacia los tres subtipos celulares neurales. En este caso nos centramos en las células obtenidas del LCF humano, las cuales se indujeron a la diferenciación utilizando medios de cultivo específicos para diferenciación neuronal, astrocitaria y oligodendrocitaria (Elkabetz and Studer 2008; Denham and Dottori 2009; Pruszek, Just et al. 2009; Trujillo, Schwindt et al. 2009; O'Brien, Keeney et al. 2015; Lins, Wianny et al. 2016). Tras 10 días de inducción a la diferenciación específica neuronal y glial, las células mostraron un importante incremento en el subtipo celular específico mediante el análisis del incremento de los marcadores proteicos de diferenciación neural en ensayos por inmunocitofluorescencia (Figura 43). De esta manera podemos decir que hemos conseguido con éxito la inducción a la diferenciación específica hacia neuronas, astrocitos y oligodendrocitos de células provenientes de LCF, hecho que refuerza la hipótesis de la capacidad de diferenciación multilineaje y de la plasticidad de estas células y su potencial utilización en ensayos de terapia celular para la regeneración neural.

Nuestros resultados derivados del estudio de muestras de LCF han demostrado las propiedades neurogénicas de las NPCs presentes en el LCF acumulado en el quiste de los fetos con MMC (manuscrito en revisión en la revista *Stem Cells Research*, 2016), como previamente se había descrito *in vitro*

para las células madre o células progenitoras neurales con distintos orígenes (Parati, Pozzi et al. 2004; Barnabe-Heider and Frisen 2008; Sandner, Prang et al. 2012; Li and Lepski 2013; Mothe and Tator 2013). De esta manera podemos afirmar que el LCF circulante por el canal medular en fetos de oveja, y especialmente, en muestras de LCF obtenido del quiste de fetos humanos con MMC contienen células precursoras neurales, las cuales poseen un elevado potencial proliferativo y de diferenciación hacia los tres linajes neurales: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos y, por tanto, pueden ser consideradas como una importante fuente celular para su trasplante *in vivo* en la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas basadas en terapia celular.

## **6. Presencia de células precursoras neurales en líquido amniótico de pacientes con espina bífida**

Debido a que el MMC se caracteriza por un defecto óseo en el cierre de la columna vertebral, una de nuestras hipótesis se basa en que a través de este defecto lumbar existe una pérdida continuada de LCF hacia el LA en fetos afectados de espina bífida *aperta*, por lo que las NPCs que se encuentran en el LCF acaban escapando al LA. Este hecho se puede dar en el caso de que el quiste que recubre el defecto se rasgue o se rompa debido al roce con las paredes del saco amniótico y los movimientos del feto, que provocan que se rompa la membrana (duramadre) que recubre la médula espinal y que forma el quiste, de manera que en estos fetos la pérdida del LCF hacia el exterior es continua. Así, en muestras de LA de pacientes con MMC podríamos encontrar las NPCs procedentes del LCF circulante por el canal medular, las cuales debido a su capacidad proliferativa y neurogénica podrían ser óptimas para su utilización en estrategias de terapia celular para la regeneración neural en fetos con MMC. Por este motivo, nos centramos además en la detección de precursores neurales en muestras de LA de pacientes con MMC y no en muestras de LA de individuos sanos, debido a que estas células provienen del LCF que escapa del canal medular a través del defecto abierto, por lo que no deberían encontrarse en muestras de LA de fetos sanos.

Así, en el presente estudio hemos establecido cultivos primarios de LA de fetos sanos y de fetos con MMC y hemos demostrado la presencia de una subpoblación celular que expresa marcadores específicos de progenitores neurales exclusivamente en células provenientes de muestras de LA de pacientes con MMC y no en muestras de LA de fetos no afectados de NTD. Los resultados obtenidos mediante ensayos por inmunocitofluorescencia

demuestran la presencia de subpoblaciones celulares con características de progenitores neurales y que expresan los mismos marcadores neurales que las NPCs presentes en el LCF, en cultivos obtenidos de muestras de LA de fetos humanos con espina bífida *aperta* (Figura 35), así como diversos marcadores neurales en muestras de LA del modelo de MMC en oveja (Figura 34). Corroborando nuestra hipótesis de partida, las células con marcaje positivo para marcadores de NPCs no aparecían en los cultivos procedentes de LA sanos, lo que refuerza la teoría de que las NPCs proceden del LCF y se difunden en el LA únicamente en pacientes con MMC debido a la abertura causada por el defecto congénito (Tsai, Lee et al. 2004; Turner, Klein et al. 2013).

Focalizando en el estudio de las muestras humanas, nuestros resultados demostraron la presencia de CD15, Sox2 y TBR2, en cultivos celulares derivados del LA de pacientes con MMC, donde más del 30% expresaban CD15 ( $31.5 \pm 6.2\%$ ), casi un 20% expresaban TBR2 ( $19.2 \pm 3.4\%$ ) y Sox2 se expresaba en casi un 10% de la población celular de LA ( $19.2 \pm 3.4\%$ ). Si bien es cierto que no se encontró expresión de los marcadores TBR2 y Sox2 en las muestras de LA procedentes de pacientes sanos, en el caso del CD15 sí se encontró un bajo porcentaje de células CD15 positivas ( $8.7 \pm 1.1\%$ ) en células derivadas del LA sano. Este hallazgo puede ser debido, probablemente, a la expresión de CD15 en menor nivel en algún otro tipo celular presente en el LA, como, por ejemplo, a causa de la presencia de neutrófilos polimorfonucleados en el LA, ya que, tanto Sox2 como CD15 se expresan de manera abundante en células localizadas a lo largo de la médula espinal; este porcentaje de marcadores neurales inmaduros que expresan las células en muestras de médula ósea de la zona lumbar y cervical ha sido previamente reportada (Dromard, Guillon et al. 2008) encontrándose que más del 80% de las células son Sox2+ y entre el 35-55% de las células son CD15+.

Tras demostrar la presencia de la subpoblación de NPCs en el LA de pacientes con MMC, nos centramos en purificar estas NPCs gracias a técnicas de discriminación utilizando marcadores específicos y en demostrar el potencial a diferenciarse hacia distintos linajes neurales, como neuronas y células gliales. El propósito fue evaluar el uso de la fracción celular enriquecida en NPCs expandiéndolas *in vitro* y considerando su uso para futuras terapias basadas en el trasplante autólogo para reparar la médula espinal en pacientes con MMC. En base a que CD15 es un marcador que está localizado en la membrana plasmática celular, representa una diana apropiada para el aislamiento de células madre y progenitoras neurales, como previamente se ha reportado en el aislamiento de *neural stem cells* a partir de la zona subventricular y el ventrículo lateral en

ratones (Capela and Temple 2002). Así, en un primer ensayo dirigido al enriquecimiento de la población de células progenitoras neurales procedimos a realizar la purificación de las NPCs presentes en el LA de pacientes con MMC mediante inmunopurificación en columna basada en la presencia del marcador específico CD15. Después del procedimiento de purificación de las células del LA de pacientes con MMC, la proporción de células CD15 positivas incrementó en más del 50% en las células resultantes CD15+ (Figura 39B).

Una vez enriquecido el cultivo celular, y con el fin de demostrar el potencial neurogénico de la población positiva para el marcador de superficie CD15, se indujo la diferenciación de las células hacia los diferentes linajes neurales por privación de factores de crecimiento. Tras esta inducción las células mostraron una disminución de la expresión de los marcadores específicos de NPCs (Cd15 y TBR2) y un aumento en la expresión de marcadores específicos de células diferenciadas (neuronas, oligodendrocitos y astrocitos) como  $\beta$ III-tubulina, CNPase y GFAP (Figura 40). Estos datos corroboran la hipótesis inicial de que las NPCs purificadas de muestras de LAs de pacientes con espina bífida pueden ser utilizadas para la regeneración del tejido neural mediante el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en el trasplante autólogo para la reparación de la médula espinal. Los resultados derivados del trabajo en muestras de LA están en proceso de redacción del manuscrito para proceder a su publicación en revistas internacionales especializadas.

Esta nueva estrategia terapéutica se basaría en el hecho de que gracias a los avances en el diagnóstico prenatal que permiten que el diagnóstico del MMC se realice de manera temprana durante el primer trimestre, se podría realizar la recogida de muestras de LA mediante la técnica mínimamente invasiva de la amniocentesis para establecer un cultivo primario de células del LA. Las células derivadas del LA podrían ser expandidas *in vitro* permitiendo el aislamiento posterior de la subpoblación celular de NPCs presentes en las muestras de LA de los pacientes con MMC. Esto representa un enfoque terapéutico novedoso y realista dada la posibilidad de expandir y aislar precursores neurales provenientes del LCF a partir de cultivos celulares del LA y su capacidad para diferenciarse hacia linajes neurales y su potencial regenerativo. De esta manera, la subpoblación celular enriquecida en NPCs podría utilizarse para el trasplante autólogo en la médula espinal durante la intervención quirúrgica en la que se realiza el cierre del defecto de MMC, que se llevaría a cabo semanas después del diagnóstico del defecto congénito y la amniocentesis para el establecimiento del cultivo celular.

## 7. Terapia celular para la regeneración neural en modelos animales de MMC

### 7.1. Modelos animales de MMC

En la literatura se han descrito diversos modelos animales para el estudio del MMC basados en la creación del defecto o bien de manera congénita o de manera quirúrgica. Los modelos animales de creación del MMC de manera congénita se han realizado básicamente en roedores (Danzer, Schwarz et al. 2005; Quemelo, Lourenco et al. 2007; Stiefel, Copp et al. 2007; Ma, Bao et al. 2012; Al-Shanafey, Fontecha et al. 2013; Escobedo, Contreras et al. 2013) y también se han descrito modelos avícolas de MMC provocándolo mediante la inyección de toxinas (Pilowsky, Hodgson et al. 1982; Kohga and Obata 1992).

Sin embargo, la creación de modelos de MMC de manera quirúrgica ha sido más ampliamente utilizada ya que permite la realización de estudios en animales de mayor tamaño, como el conejo o la oveja, los cuales son más cercanos filogenéticamente al feto humano. El modelo de MMC en el feto ovino fue el primer modelo quirúrgico del MMC en modelos animales grandes y fue publicado por *Meuli* en el año 1995 (Meuli, Meuli-Simmen et al. 1995), este estudio permitió además una categorización del nivel del daño creado en el feto ovino (Brown, Keller et al. 2015). En el año 2000 se describió el modelo de creación quirúrgico de MMC en conejo como un nuevo ejemplo de estudio en el que se podían investigar terapias y características de la enfermedad, ya que se postulaba como suficientemente representativo de lo que sucede en el MMC humano (Housley, Graf et al. 2000). En los últimos años, se han llevado a cabo multitud de estudios utilizando ambos modelos, aunque el modelo fetal de oveja ha sido el más ampliamente utilizado dado que presenta algunas ventajas frente al de conejo, como un mayor tiempo de gestación o el mayor tamaño del feto, lo que permite una manipulación más similar a la del feto humano y además se pueden realizar diferentes intervenciones quirúrgicas en la misma gestación. En este sentido, cabe indicar que nuestro grupo de investigación es experto en el uso de ambos modelos quirúrgicos, donde se han evaluado diferentes características de esta patología, tanto en el modelo fetal en conejos, en el que se ha estudiado cómo afectaría el avance del parto en el desarrollo de la malformación asociada al MMC de Chiari II (Fontecha, Aguire et al. 2010), o el efecto que tendría sobre el MMC el tratamiento con esteroides y el parto pretérmino (Fontecha, Peiro et al. 2007), como en el de feto ovino, en el que se han estudiado, por ejemplo, la presencia de malformaciones en la vejiga de

ovejas con MMC (Encinas, Germani et al. 2010), la prevención de malformaciones en el SNC en función del tipo de cobertura del defecto de MMC (Encinas, Germani et al. 2010) o el ensayo de la idoneidad de diferentes tipos de sellantes biocompatibles para la reparación del defecto (Fontecha, Peiro et al. 2009; Fontecha, Peiro et al. 2011). Además, el modelo ovino de MMC ha sido utilizado por nuestro equipo de investigación con el fin de desarrollar y trasladar a la clínica humana nuevas aproximaciones quirúrgicas mínimamente invasivas para la reparación del MMC mediante fetoscopia lo que genera menor riesgo en la cirugía y el post-operatorio tanto para el feto como para la madre gestante (Peiro, Fontecha et al. 2013). Cabe destacar además, que como resultado de los estudios llevados a cabo en modelos animales, nuestro equipo clínico ya ha trasladado a la clínica humana la utilización de nuevas aproximaciones terapéuticas basadas en estas innovadoras técnicas quirúrgicas mínimamente invasivas y en el uso de biomateriales para reparación quirúrgica de la espina bífida. De hecho, ya han sido tratados por nuestro equipo médico más de 30 casos de pacientes con MMC mediante cirugía prenatal en proyectos colaborativos entre los Hospitales Vall d'Hebrón (Barcelona, España), el Hospital Infantil de Cincinnati (CCHMC, Cincinnati, Ohio, USA) y el Hospital Infantil de Houston (*Texas Childrens Hospital*, THC, Houston TX, USA).

Finalmente, el defecto del MMC también ha sido estudiado en modelo de primates no humanos, donde se han realizado pruebas de la inducción del MMC mediante teratogénicos (Michejda and McCollough 1987), además del modelo de inducción del MMC mediante cirugía, el cual se ha postulado como un excelente modelo de estudio del daño neural provocado por el MMC y posibles opciones de tratamiento prenatal (Galvan-Montano, Cardenas-Lailson et al. 2007; Galvan-Montano, Hernandez-Godinez et al. 2010; Hernandez-Godinez, Ibanez-Contreras et al. 2011).

#### **7.1.1. Modelo de MMC en conejas gestantes**

Uno de los modelos animales más utilizados para estudios en espina bífida ha sido el de conejo, ya que tiene un tamaño fetal que permite una correcta manipulación, un tiempo de gestación relativamente corto con el que se consiguen resultados en poco tiempo y es un modelo económico y fácilmente manipulable con respecto al de oveja (Housley, Graf et al. 2000). El modelo de MMC en feto de conejo permite la realización de diversas pruebas en cuanto al tipo de *scaffold* a utilizar y el número de células a trasplantar, como un paso previo al escalado a un animal de mayor tamaño como el modelo de oveja. Por

ello, pese a que nuestro grupo tiene perfectamente optimizado el modelo de MMC en oveja (Fontecha, Peiro et al. 2009; Encinas, Germani et al. 2010; Encinas, Germani et al. 2010; Peiro, Fontecha et al. 2013) se escogió el modelo en conejo para realizar las pruebas de trasplante celular y de ensayo de optimización de *scaffolds* (Fontecha, Peiro et al. 2007; Fontecha, Aguire et al. 2010). En los modelos de MMC en lagomorfos, la lesión que imita al MMC es una lesión quirúrgica que se realiza a día 23 de gestación, en la que se realiza una incisión en la zona lumbar del feto del conejo, seguida de una laminectomía y una resección de tres arcos vertebrales, abriendo la duramadre y permitiendo la exposición de la médula espinal y la pérdida de líquido cefalorraquídeo a través del defecto (Pedreira, Valente et al. 2003; Fontecha, Aguire et al. 2010).

Debido a que el periodo de gestación en conejas es corto (30 días) y que las conejas presentan una tasa de supervivencia muy baja en caso de la realización de dos cirugías prenatales, a diferencia del modelo de oveja el cual sí que permite la creación del defecto de MMC en una primera cirugía y semanas más tarde proceder a la reparación del defecto mediante una segunda cirugía, se desarrolló un nuevo modelo de lesión de MMC en conejas gestantes en el cuál se combinaba la intervención quirúrgica ya descrita en la literatura, con una lesión química producida por la aplicación de un detergente sobre la médula espinal del feto para producir una abrasión y lesión del tejido neural similar a la que se produce en los casos de mielomeningocele en fetos humanos. De esta manera, las primeras pruebas para la optimización del trasplante celular, las realizamos en el modelo de feto de conejo, como, por ejemplo, el número de células a implantar o el tipo de *scaffold* a utilizar. En base a los numerosos estudios publicados sobre las ventajas de la utilización del modelo quirúrgico de conejo (Housley, Graf et al. 2000; Fontecha, Peiro et al. 2007; Fontecha, Aguire et al. 2010; Peiro, Fontecha et al. 2013) debido a la facilidad de manipulación de los fetos, la consecución de resultados en un corto periodo de tiempo (la gestación del conejo dura un mes) y la viabilidad económica que conlleva, en este estudio generamos un novedoso modelo experimental (Figura 45) basado en la combinación de la lesión quirúrgica provocada por la laminectomía y la retirada de tres arcos vertebrales, seguida de una lesión química inducida por la puesta en contacto de la médula espinal con un detergente irritante con la que conseguimos un daño medular similar al que se produce en los casos congénitos de MMC humano (manuscrito en preparación, 2016) sobre el que realizamos las primeras pruebas para la optimización de las diferentes variables del trasplante celular.

### **7.1.2. Modelo de MMC en ovejas gestantes**

Nuestro grupo de investigación ha utilizado ampliamente el modelo de MMC quirúrgico en feto de oveja, el cuál ha sido extensamente utilizado para el estudio del daño sobre el tejido neural provocado por el defecto congénito y su posterior reparación quirúrgica, dado que el tiempo de gestación es suficientemente largo como para permitir realizar en el feto dos intervenciones; una primera cirugía para crear el defecto y otra cirugía, semanas después, para proceder a su reparación (Meuli, Meuli-Simmen et al. 1995; Fontecha, Peiro et al. 2009; Encinas, Germani et al. 2010; Encinas, Germani et al. 2010; Peiro, Fontecha et al. 2013). Además, el tamaño del feto es muy similar al humano lo que permite realizar pruebas con una metodología similar a la que se realizaría en caso de una aproximación terapéutica en el feto humano.

Como se ha descrito ampliamente en la literatura el modelo de MMC en ovino consiste en una primera cirugía, alrededor de los 75 días de gestación en la que se realiza la creación de la lesión, mediante la exposición del útero de la madre gestante, y posteriormente la exposición de la zona lumbar del feto, en la cual se realiza una laminectomía y se retiran tres arcos vertebrales que permitirán acceder a la médula espinal. Una vez expuesta la médula, se abre la duramadre por vía quirúrgica para permitir la exposición del tejido neural al ambiente uterino y la salida del LCF a través del defecto como en el caso de los fetos humanos. Finalmente, el feto se reintroduce en la bolsa amniótica, y se cierra tanto el útero como todas las capas externas de la oveja para continuar con el proceso de gestación. Unos 20 días más tarde se procede a la reparación del defecto mediante una segunda cirugía donde se vuelve a exponer al feto y se repara el defecto, tras el periodo de tiempo en el que la médula ha estado expuesta al ambiente uterino y se ha producido el daño mecánico y químico causante de la patología. En esta segunda cirugía reparadora es donde se ha ensayado la terapia celular en el modelo ovino.

### **7.2. Trasplante celular en modelos animales**

El concepto de terapia celular para el tratamiento del MMC a partir de células derivadas del líquido amniótico para la regeneración de la médula espinal fue introducido hace más de una década por el grupo del Dr. Dario Fauza (Kaviani, Perry et al. 2001; Kaviani, Guleserian et al. 2003; Kunisaki, Armant et al. 2007; Steigman, Armant et al. 2008; Hosper, Bank et al. 2014). Dado que, las anomalías congénitas son diagnosticadas a través de técnicas de imagen, las

muestras de líquido amniótico pueden obtenerse a través de una amniocentesis y proceder a la expansión y cultivo de estas células para después, en el momento de reparación fetal intrauterina poder utilizarlas en aproximaciones terapéuticas basadas en la terapia celular (Klemmt, Vafaizadeh et al. 2011).

Estudios previos de trasplante celular en modelos animales de espina bífida, han demostrado la posibilidad de implantación de células sobre la médula espinal. El trasplante de células mesenquimales de líquido amniótico mediante el uso de diferentes vehículos y en diversos tipos de lesiones del tejido medular se ha realizado con éxito demostrando la capacidad de las células trasplantadas de integrarse en la médula espinal (Klein, Turner et al. 2011; Dionigi, Ahmed et al. 2015; Dionigi, Brazzo et al. 2015), lo que refuerza las posibilidades de éxito de nuestra estrategia de trasplante celular sobre el tejido medular dañado utilizando precursores neurales obtenidos de muestras del propio paciente.

En el modelo de MMC congénito en rata obtenido mediante la administración de RA se ha conseguido la colonización celular de los tejidos neurales lesionados con la inyección de células neurales aisladas a partir del LA (Turner, Pennington et al. 2013). También con este mismo modelo en ratas e inyectando MSCs derivadas de la médula ósea se ha conseguido la diferenciación hacia motoneuronas de estas células trasplantadas y que además éstas se interioricen en el lugar de la lesión (Li, Gao et al. 2012; Li, Miao et al. 2014; Ma, Wei et al. 2015). A parte de mejorar la lesión causada por el MMC a nivel local se ha descrito también que la inyección de células mejora notablemente patologías asociadas a la espina bífida como la malformación de Chiari II (Dionigi, Brazzo et al. 2015). El trasplante celular en modelo de rata no sólo se ha realizado mediante inyección de las células sino que también se han trasplantado células embebidas en diferentes *scaffolds* y se ha conseguido que la lesión se reduzca y repare la región lesionada (Watanabe, Li et al. 2011; Li, Yuan et al. 2016). Además, del LA de fetos de ratas con MMC congénito se han conseguido aislar NSCs, lo que consiguió abrir numerosas posibilidades para su uso futuro en la práctica clínica consistente en aislar precursores neurales a partir de LA de pacientes con MMC, expandir las células y reintroducirlas mediante el trasplante autólogo (Turner, Klein et al. 2013).

La terapia celular llevada a cabo durante la etapa fetal ya sea mediante el uso de células derivadas de la médula ósea o del propio líquido amniótico presenta varias ventajas, ya que el rápido crecimiento del feto ayuda a la integración y expansión de las células trasplantadas. Además, el inmaduro sistema inmune del feto permite el trasplante de células humanas, como se ha

demostrado previamente (Zanjani, Pallavacini et al. 1992; Schoeberlein, Holzgreve et al. 2004), especialmente cuánto más temprano en la gestación se produzca el trasplante celular. También se ha descrito con anterioridad la capacidad de diferenciación *in vivo* de células derivadas de la médula ósea hacia células del linaje neural tras el trasplante en fetos (Muench and Barcena 2004), e incluso en el modelo de feto de oveja se han realizado con éxito xenotrasplantes a partir de NSCs aisladas de ratones y se ha demostrado cómo estas células se mantienen en la zona del trasplante y secretan factores neurotróficos (Fauza, Jennings et al. 2008). Otra fuente de células utilizada en estudios previos en xenotrasplante en feto de oveja con MMC han sido las iPS derivadas hacia células de la cresta neural, con las que se consiguió su integración, supervivencia y diferenciación en el tejido medular dañado (Fauza, Jennings et al. 2008; Saadai, Wang et al. 2013).

En nuestro estudio, el trasplante celular se ensayó en modelos animales de MMC, tanto en modelo experimental de conejo como el de oveja. Las células que se utilizaron para el trasplante procedían del cultivo primario de LCF de origen humano, obtenidas a partir de muestras de LCF de pacientes con MMC. Con el fin de localizar las células tras el trasplante, éstas fueron transfectadas con un virus (LscC-RFP-W) que expresaba la proteína fluorescente roja RFP. Una vez obtenidas las NPCs en cultivo para su uso en estrategias de terapia celular, procedimos a la realización de ensayos de trasplante celular *in vivo* en modelos experimentales de MMC. Para ello, las células se deben trasplantar utilizando un *scaffold* apropiado para su implantación sobre la zona del defecto de la médula espinal y evaluar si las células implantadas tienen viabilidad y capacidad de colonizar la médula espinal para luego promover la regeneración neural del tejido. Esta nueva aproximación terapéutica se ha ensayado utilizando modelos animales con MMC inducidos quirúrgicamente, como el modelo fetal de MMC en conejo y oveja en los que nuestro equipo de investigación tiene una amplia experiencia (Fontecha, Peiro et al. 2009; Fontecha, Aguire et al. 2010; Peiro, Fontecha et al. 2013) y poder determinar así los efectos terapéuticos *in vivo* de la regeneración del daño de la médula espinal.

### **7.2.1. Trasplante celular en modelo de lesión neural en lagomorfos.**

Una vez optimizado el nuevo modelo en conejo de MMC y daño neural se procedió a la realización de las primeras pruebas de trasplante celular y evaluación de diferentes *scaffolds* en los que incluir las células precursoras neurales a trasplantar (Figura 48).

Tras diversas pruebas en modelo de feto de conejo, se optimizó el trasplante de células cultivadas a partir de muestras de LCF humano. Así, se realizó con éxito el trasplante de  $5 \times 10^5$  células previamente incluidas en un *scaffold* de fibrina el cual formó una estructura gelatinosa y semi-sólida que permitió implantarlo sobre el tejido neural, de manera similar a lo que ha sido previamente descrito en diferentes trabajos para el trasplante celular en espina bífida (Saadai, Nout et al. 2011). La composición adecuada del *scaffold* se ensayó tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando el modelo de feto de conejo, de manera que se optimizó la composición y textura óptimas que permitían la colonización y proliferación de las células incluidas en él y su aplicación sobre la médula espinal. Tras el trasplante celular, se permitió la progresión de la gestación hasta los 30 días, momento en el cual se extrajeron los fetos por cesárea y se aisló la zona lumbar para su evaluación histológica y por inmunofluorescencia. Nuestros resultados demostraron la presencia de las células trasplantadas en el mismo punto de la lesión medular donde se colocaron en el momento del trasplante y su viabilidad en feto de conejo hasta siete días después del trasplante, lo que nos permitió abordar el trasplante en modelo ovino el cual representa fielmente la patología humana.

Cabe destacar que el nuevo modelo de MMC en feto de conejo desarrollado en el presente estudio (Figura 45- Figura 49), es totalmente novedoso y en estos momentos se está procediendo a la redacción del manuscrito para su publicación en revistas internacionales especializadas. Así mismo, no existen datos publicados con anterioridad sobre el trasplante celular en modelo de conejo con MMC, por lo que podemos decir que nuestros estudios son pioneros en el uso del modelo de feto de conejo para la evaluación de nuevas aproximaciones basadas en terapia celular utilizando modelos de MMC en fetos de conejo.

### **7.2.2. Trasplante celular en modelo de lesión neural en ovejas.**

Una vez comprobado con éxito el trasplante celular en el modelo de lesión de espina bífida en el conejo se procedió al ensayo de la terapia celular en el modelo de MMC en el feto ovino. La metodología utilizada para el trasplante en modelo ovino fue similar a la que se realizó en el modelo de conejo, de manera que las células obtenidas a partir del LCF humano se transfectaron con el virus LscC-RFP-W que expresaba la proteína fluorescente roja RFP, y se preparó un constructo del doble del tamaño que en el caso del trasplante en feto de conejo, en el que se embebieron  $1 \times 10^6$  células.

En la literatura ya se había descrito que el trasplante de células madre neurales podía mejorar el estado neurológico en diferentes modelos animales de lesiones medulares en el modelo ovino, aunque es cierto que existe una elevada controversia en cuanto al trasplante de NPCs en la clínica humana (Wang, Tang et al. 2011; Jin, Bouyer et al. 2016).

Los resultados derivados de nuestro estudio demuestran que tras el trasplante celular sobre la lesión de MMC en feto de oveja, las células se mantienen en la zona trasplantada más de un mes después de que éste se hubiese realizado, e incluso se detecta la colonización del tejido medular como demuestra la localización celular detectada por la expresión del transgen fluorescente. Todo ello implica que el trasplante celular en feto es factible, que las células presentan viabilidad en tiempos largos tras el trasplante celular y que los precursores neurales pueden colonizar el tejido medular dañado en fetos de oveja con MMC.

Pese a que aún son necesarios estudios adicionales para demostrar si las células trasplantadas son capaces de regenerar el tejido neural dañado y promover la migración, proliferación y diferenciación celular para la formación de circuitos neurales, así como evaluar la implicación neurológica y motora que podría tener la integración de las mismas en la zona medular dañada del sistema nervioso del animal, los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten abrir la posibilidad de generar innovadoras vías terapéuticas basadas en la terapia celular para la regeneración neural en pacientes afectados de MMC.

En resumen, los resultados obtenidos en el trabajo aquí presentado son prometedores y permiten abrir la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas en la clínica humana para la regeneración neural en pacientes con MMC incluyendo el hecho de que estas células puedan proceder de muestras de LCF o de LA del mismo paciente con el objetivo de realizar una trasplante celular autólogo. En este sentido nuestro centro es referencia a nivel nacional e internacional en el tratamiento de la espina bífida, en colaboración directa con el *Cincinnati Children's Hospital* y recientemente ha creado un "Programa transversal de Investigación: *Spina Bifida Unit for research and lifetime healthcare*" con el fin de avanzar en el conocimiento y en el tratamiento de la Espina Bífida en colaboración entre el *Institut de Recerca (VHIR)* y el Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebrón. Este programa multidisciplinar incluye la investigación conjunta desde varios grupos de investigación: medicina materno-fetal, medicina genética, bioingeniería, terapia celular y cirugía en malformaciones congénitas, cirugía reconstructiva del aparato locomotor,

neurología pediátrica y la Unidad de investigación en neurotraumatología y neurocirugía (UNINN), lo que nos permitiría abordar con garantías el ensayo de nuevos protocolos terapéuticos basados en terapia celular autóloga para el tratamiento de pacientes con espina bífida.







## **Conclusiones**



En base a los resultados derivados del trabajo de la presente tesis doctoral, hemos obtenido las siguientes **conclusiones**:

1. El LCF presente en el quiste que recubre el defecto congénito de MMC humano, así como el LCF que circula por el canal medular de fetos de oveja, contienen células con características de progenitores neurales con capacidad de regeneración del tejido medular.

2. Se ha establecido con éxito el cultivo primario de células provenientes de LCF humano y del modelo de feto ovino, así como su elevada capacidad proliferativa en cultivo primario para la expansión celular (como potencial fuente celular en futuras estrategias basadas en terapia celular) y su capacidad de diferenciación *in vitro* a células específicas de los tres linajes neurales (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos).

3. Hemos demostrado la presencia de NPCs provenientes del LCF en muestras de LA de pacientes con MMC, así como la posibilidad de aislar las NPCs mediante técnicas de purificación celular, lo que lo convierte en una nueva fuente de progenitores neurales para futuras estrategias de terapia celular autóloga en base a la posibilidad de purificación de NPCs a partir de muestras de LAs de pacientes con espina bífida *aperta*.

4. Se han optimizado las condiciones para la generación de constructos de las NPCs obtenidas de pacientes con MMC en combinación con *scaffolds* biocompatibles que permitan su trasplante celular sin afectar a su viabilidad, y capacidad de crecimiento y migración.

5. Hemos desarrollado con éxito un nuevo modelo *in vivo* de MMC en feto de conejo que imita la lesión inducida por el MMC congénito en humanos y el cual permite el ensayo de las condiciones para el trasplante celular en la médula espinal dañada.

6. Se ha ensayado con éxito el trasplante celular de las NPCs obtenidas de pacientes con espina bífida en diferentes modelos animales de MMC, en feto de conejo y oveja, y se ha demostrado la supervivencia e implantación de las células trasplantadas en la médula espinal dañada en la etapa post-natal en modelos animales.

7. Aunque son necesarios más estudios para analizar la efectividad de las NPCs *in vivo* para colonizar y reparar el tejido neural dañado, así como la evaluación funcional, sensorial y motora, en los animales tratados con terapia celular, nuestros resultados abren la posibilidad de desarrollar una nueva vía terapéutica para el tratamiento y mejora de la morbi-mortalidad en los pacientes de espina bífida y la posibilidad de iniciar futuros ensayos clínicos basados en la terapia celular autóloga en estos pacientes.







# **Agradecimientos**



Cuando decidí embarcarme en la aventura de comenzar la tesis doctoral fue algo totalmente inesperado, ya que nunca pensé que podría realizarla; pero, mis directores de tesis, por los que siento una gran admiración tanto profesional como personalmente, me brindaron esta gran oportunidad que concluyo con muchísima satisfacción y agradeciéndoselo a todos aquellos que me han acompañado en este camino.

Mario, no sé si podré agradecerte que me hayas enseñado todo lo que sé de ciencia, gracias por compartir todos tus conocimientos conmigo y por ayudarme siempre, tanto dentro como fuera del laboratorio; es mucho el orgullo que siento de haber sido tu doctoranda y soy muy consciente de que he tenido mucha suerte de que hayas sido mi director, gracias por creer en mí.

José Luis, gracias por dejarme formar parte de tu equipo, recién formado entonces y abriéndome las puertas del laboratorio tanto aquí en Barcelona como años después en EEUU cuando me brindaste la oportunidad de acompañarte a Cincinnati, gracias por confiar en mí y ayudarme a sacar este trabajo adelante.

A mis compañeras de Vall d' Hebrón, por ser algo más que colegas de laboratorio y convertirse en amigas; amigas de aquellas con las que pasas muchísimas horas juntas y no te cansas, con las que compartes momentos, experiencias, consejos y frustraciones, pero de esas que cuando parece que no ves la luz te ayudan a encender una lamparita que te permite verlo todo mucho mejor. Especialmente, gracias a Cris y Pao, por ser como sois, por vuestra forma de ver las cosas que me ha ayudado tantísimo, porque me habéis cuidado todo este tiempo y habéis estado a mi lado aun cuando yo ya estaba lejos.

A mis compañeros de Biología Molecular que han vivido conmigo el último tramo de esta tesis doctoral, que me han ayudado en todo lo posible y han hecho que todo fuese un poco más fácil, gracias por acogerme tan bien y hacerme sentir una más.

A mi familia, que han recorrido TODO el camino, incondicionalmente, a mi lado, de mi mano, que me han visto crecer en los diferentes ámbitos, muchísimas gracias. Ellos han vivido conmigo lo duro que es estar separados, pero me han apoyado siempre y han hecho que al final todo valga la pena por este trabajo, mil gracias.

A mis amigas de toda vida, que han visto como me he hecho mayor trabajando en este mundo, y a las que me encanta explicarles en qué consiste esto de "hacer ciencia"; con las que sé que puedo contar, aunque sea también

en la distancia y que, cuando vuelvo a casa sé que están allí, para darme esa dosis de energía cuando ésta parece que se agota.

A ti Aina, gracias no sólo por tu amistad incondicional y sincera, sino porque también has caminado junto a mí en esta etapa, las dos viviendo esta aventura casi simultáneamente, como venimos haciendo desde que nos conocimos, gracias por todo tu apoyo.

A los amigos que esta aventura en Barcelona me ha dado la oportunidad de conocer; la familia escogida cuando estás fuera de tu casa y que te ayudan en el día a día aún cuando pertenecen a mundos completamente distintos pero que son indispensables para completar el tuyo.

**Mil gracias a todos**





## **Bibliografía**



- Abdullah, R. H., N. Y. Yaseen, et al. (2016). "Induction of mice adult bone marrow mesenchymal stem cells into functional motor neuron-like cells." J Chem Neuroanat 77: 129-142.
- Adzick, N. S. (2010). "Fetal myelomeningocele: natural history, pathophysiology, and in-utero intervention." Semin Fetal Neonatal Med 15(1): 9-14.
- Adzick, N. S., L. N. Sutton, et al. (1998). "Successful fetal surgery for spina bifida." Lancet 352(9141): 1675-1676.
- Adzick, N. S., E. A. Thom, et al. (2011). "A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele." N Engl J Med 364(11): 993-1004.
- Al-Shanafey, S. N., C. G. Fontecha, et al. (2013). "Reduction in neural injury with earlier delivery in a mouse model of congenital myelomeningocele: laboratory investigation." J Neurosurg Pediatr 12(4): 390-394.
- Barnabe-Heider, F. and J. Frisen (2008). "Stem cells for spinal cord repair." Cell Stem Cell 3(1): 16-24.
- Begum, A. N., C. Guoynes, et al. (2015). "Rapid generation of sub-type, region-specific neurons and neural networks from human pluripotent stem cell-derived neurospheres." Stem Cell Res 15(3): 731-741.
- Bellenberg, B., R. Schneider, et al. (2015). "Cervical cord area is associated with infratentorial grey and white matter volume predominantly in relapsing-remitting multiple sclerosis: A study using semi-automated cord volumetry and voxel-based morphometry." Mult Scler Relat Disord 4(3): 264-272.
- Bieback, K., S. Kern, et al. (2004). "Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood." Stem Cells 22(4): 625-634.
- Bokara, K. K., J. H. Kim, et al. (2016). "Transfection of arginine decarboxylase gene increases the neuronal differentiation of neural progenitor cells." Stem Cell Res 17(2): 256-265.
- Bottai, D., G. Scesa, et al. (2014). "Third trimester NG2-positive amniotic fluid cells are effective in improving repair in spinal cord injury." Exp Neurol 254: 121-133.
- Botto, L. D., C. A. Moore, et al. (1999). "Neural-tube defects." N Engl J Med 341(20): 1509-1519.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-254.
- Brennand, D. M., A. M. Jehanli, et al. (1998). "Raised levels of maternal serum secretory acetylcholinesterase may be indicative of fetal neural tube defects in early pregnancy." Acta Obstet Gynecol Scand 77(1): 8-13.
- Brown, E. G., B. A. Keller, et al. (2015). "Innate healing in the fetal sheep model of myelomeningocele: A standardized defect grading system." J Pediatr Surg 50(7): 1134-1136.

- Bruner, J. P., N. Tulipan, et al. (1999). "Fetal surgery for myelomeningocele and the incidence of shunt-dependent hydrocephalus." JAMA 282(19): 1819-1825.
- Bruner, J. P., N. B. Tulipan, et al. (2000). "In utero repair of myelomeningocele: a comparison of endoscopy and hysterotomy." Fetal Diagn Ther 15(2): 83-88.
- Buddensiek, J., A. Dressel, et al. (2010). "Cerebrospinal fluid promotes survival and astroglial differentiation of adult human neural progenitor cells but inhibits proliferation and neuronal differentiation." BMC Neurosci 11: 48.
- Campbell, L. R., H. S. Ball, et al. (1987). "Relationship of early neural tube appearance to myeloschisis in a chick embryo model." Exp Neurol 96(3): 661-671.
- Capela, A. and S. Temple (2002). "LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal." Neuron 35(5): 865-875.
- Copeland, M. L., J. P. Bruner, et al. (1993). "A model for in utero endoscopic treatment of myelomeningocele." Neurosurgery 33(3): 542-544; discussion 545.
- Copp, A. J. and N. D. Greene (2013). "Neural tube defects--disorders of neurulation and related embryonic processes." Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 2(2): 213-227.
- Copp, A. J., N. D. Greene, et al. (2003). "Dishevelled: linking convergent extension with neural tube closure." Trends Neurosci 26(9): 453-455.
- Cummings, B. J., N. Uchida, et al. (2005). "Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice." Proc Natl Acad Sci U S A 102(39): 14069-14074.
- Chambers, S. M., C. A. Fasano, et al. (2009). "Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling." Nat Biotechnol 27(3): 275-280.
- Chang, Y. J., H. L. Su, et al. (2015). "Isolation of Human Neural Stem Cells from the Amniotic Fluid with Diagnosed Neural Tube Defects." Stem Cells Dev 24(15): 1740-1750.
- Dady, A., E. Havis, et al. (2014). "Junctional neurulation: a unique developmental program shaping a discrete region of the spinal cord highly susceptible to neural tube defects." J Neurosci 34(39): 13208-13221.
- Danzer, E., U. Schwarz, et al. (2005). "Retinoic acid induced myelomeningocele in fetal rats: characterization by histopathological analysis and magnetic resonance imaging." Exp Neurol 194(2): 467-475.
- Danzer, E., L. Zhang, et al. (2011). "Amniotic fluid levels of glial fibrillary acidic protein in fetal rats with retinoic acid induced myelomeningocele: a potential marker for spinal cord injury." Am J Obstet Gynecol 204(2): 178 e171-111.
- De Coppi, P., G. Bartsch, Jr., et al. (2007). "Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy." Nat Biotechnol 25(1): 100-106.

- De Filippis, L., D. Ferrari, et al. (2008). "Immortalization of human neural stem cells with the c-myc mutant T58A." PLoS One 3(10): e3310.
- de Graaf, M. T., A. H. de Jongste, et al. (2011). "Flow cytometric characterization of cerebrospinal fluid cells." Cytometry B Clin Cytom 80(5): 271-281.
- Denham, M. and M. Dottori (2009). "Signals involved in neural differentiation of human embryonic stem cells." Neurosignals 17(4): 234-241.
- Dias, M. S. and D. G. McLone (1993). "Hydrocephalus in the child with dysraphism." Neurosurg Clin N Am 4(4): 715-726.
- Dionigi, B., A. Ahmed, et al. (2015). "Partial or complete coverage of experimental spina bifida by simple intra-amniotic injection of concentrated amniotic mesenchymal stem cells." J Pediatr Surg 50(1): 69-73.
- Dionigi, B., J. A. Brazzo, 3rd, et al. (2015). "Trans-amniotic stem cell therapy (TRASCET) minimizes Chiari-II malformation in experimental spina bifida." J Pediatr Surg 50(6): 1037-1041.
- Doepfner, T. R., V. Traut, et al. (2016). "Conditioned Medium Derived from Neural Progenitor Cells Induces Long-term Post-ischemic Neuroprotection, Sustained Neurological Recovery, Neurogenesis, and Angiogenesis." Mol Neurobiol.
- Doetsch, F. (2003). "The glial identity of neural stem cells." Nat Neurosci 6(11): 1127-1134.
- Dolk, H., M. Loane, et al. (2010). "The prevalence of congenital anomalies in Europe." Adv Exp Med Biol 686: 349-364.
- Drewek, M. J., J. P. Bruner, et al. (1997). "Quantitative analysis of the toxicity of human amniotic fluid to cultured rat spinal cord." Pediatr Neurosurg 27(4): 190-193.
- Dromard, C., H. Guillon, et al. (2008). "Adult human spinal cord harbors neural precursor cells that generate neurons and glial cells in vitro." J Neurosci Res 86(9): 1916-1926.
- Elkabetz, Y. and L. Studer (2008). "Human ESC-derived neural rosettes and neural stem cell progression." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 73: 377-387.
- Encinas, J. L., M. Germani, et al. (2010). "[Bladder malformations in a model of myelomeningocele. Preliminary report]." Cir Pediatr 23(2): 122-125.
- Encinas, J. L., M. Germani, et al. (2010). "[Prenatal techniques to prevent central nervous system malformations in the surgically induced model of myelomeningocele]." Cir Pediatr 23(1): 59-64.
- Escobedo, N., O. Contreras, et al. (2013). "Syndecan 4 interacts genetically with Vangl2 to regulate neural tube closure and planar cell polarity." Development 140(14): 3008-3017.
- Evans, G. R. (2000). "Challenges to nerve regeneration." Semin Surg Oncol 19(3): 312-318.
- Fauza, D. O., R. W. Jennings, et al. (2008). "Neural stem cell delivery to the spinal cord in an ovine model of fetal surgery for spina bifida." Surgery 144(3): 367-373.

- Flax, J. D., S. Aurora, et al. (1998). "Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes." Nat Biotechnol 16(11): 1033-1039.
- Flick, A., D. Krakow, et al. (2014). "Routine measurement of amniotic fluid alpha-fetoprotein and acetylcholinesterase: the need for a reevaluation." Am J Obstet Gynecol 211(2): 139 e131-136.
- Florio, M. and W. B. Huttner (2014). "Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex." Development 141(11): 2182-2194.
- Fontecha, C. G., M. Aguire, et al. (2010). "Effects of birth advancement in Chiari malformation in a surgical myelomeningocele model in rabbits." J Pediatr Surg 45(3): 594-599.
- Fontecha, C. G., J. L. Peiro, et al. (2009). "Inert patch with bioadhesive for gentle fetal surgery of myelomeningocele in a sheep model." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 146(2): 174-179.
- Fontecha, C. G., J. L. Peiro, et al. (2007). "The effect of prenatal treatment with steroids and preterm delivery in a model of myelomeningocele on the rabbit foetus." Pediatr Surg Int 23(5): 425-429.
- Fontecha, C. G., J. L. Peiro, et al. (2011). "Fetoscopic coverage of experimental myelomeningocele in sheep using a patch with surgical sealant." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 156(2): 171-176.
- Fukuchi, Y., H. Nakajima, et al. (2004). "Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential." Stem Cells 22(5): 649-658.
- Galvan-Montano, A., E. Cardenas-Lailson, et al. (2007). "[Development of an animal model of myelomeningocele and options for prenatal treatment in Macaca mulatta]." Cir Cir 75(5): 357-362.
- Galvan-Montano, A., B. Hernandez-Godinez, et al. (2010). "Anesthetic management in intrauterine surgery to evaluate an experimental model of myelomeningocele in non human primates (Macaca mulatta)." Acta Cir Bras 25(3): 294-297.
- Gargett, C. E., K. E. Schwab, et al. (2009). "Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium." Biol Reprod 80(6): 1136-1145.
- Golob, J. L., S. L. Paige, et al. (2008). "Chromatin remodeling during mouse and human embryonic stem cell differentiation." Dev Dyn 237(5): 1389-1398.
- Gonzalez-Perez, O. (2012). "Neural stem cells in the adult human brain." Biol Biomed Rep 2(1): 59-69.
- Greene, N. D. and A. J. Copp (2009). "Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube." Prenat Diagn 29(4): 303-311.
- Heffez, D. S., J. Aryanpur, et al. (1990). "The paralysis associated with myelomeningocele: clinical and experimental data implicating a preventable spinal cord injury." Neurosurgery 26(6): 987-992.

- Henke, D., D. Gorgas, et al. (2016). "Longitudinal extension of myelomalacia by intramedullary and subdural hemorrhage in a canine model of spinal cord injury." Spine J 16(1): 82-90.
- Hermann, A., R. Gastl, et al. (2004). "Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells." J Cell Sci 117(Pt 19): 4411-4422.
- Hernandez-Godinez, B., A. Ibanez-Contreras, et al. (2011). "Latencies obtained of the somatosensory evoked potentials of the median and tibial nerve in rhesus monkey undergoing intrauterine laminectomy to simulate myelomeningocele." Cir Cir 79(3): 237-241, 257-262.
- Hjelm, B. E., C. Grunseich, et al. (2016). "Mifepristone-inducible transgene expression in neural progenitor cells in vitro and in vivo." Gene Ther 23(5): 424-437.
- Hodge, R. D., T. D. Kowalczyk, et al. (2008). "Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output." J Neurosci 28(14): 3707-3717.
- Hodge, R. D., B. R. Nelson, et al. (2012). "Tbr2 is essential for hippocampal lineage progression from neural stem cells to intermediate progenitors and neurons." J Neurosci 32(18): 6275-6287.
- Hong, Y. J., J. S. Kim, et al. (2016). "In Vivo Generation of Neural Stem Cells Through Teratoma Formation." Stem Cells Dev 25(17): 1311-1317.
- Hosper, N. A., R. A. Bank, et al. (2014). "Human amniotic fluid-derived mesenchymal cells from fetuses with a neural tube defect do not deposit collagen type I protein after TGF-beta1 stimulation in vitro." Stem Cells Dev 23(5): 555-562.
- Hosseini, S. M., M. Farahmandnia, et al. (2015). "A Novel Cell Therapy Method for Recovering after Brain Stroke in Rats." Int J Stem Cells 8(2): 191-199.
- Housley, H. T., J. L. Graf, et al. (2000). "Creation of myelomeningocele in the fetal rabbit." Fetal Diagn Ther 15(5): 275-279.
- Hrebikova, H., D. Cizkova, et al. (2015). "Cell Stratification, Spheroid Formation and Bioscaffolds Used to Grow Cells in Three Dimensional Cultures." Acta Medica (Hradec Kralove) 58(3): 79-85.
- Hu, Y. F., K. Gourab, et al. (2010). "Epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC)-mediated recovery of sensory function in a mouse model of spinal cord injury." Stem Cell Rev 6(2): 186-198.
- Hung, S. C., N. J. Chen, et al. (2002). "Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow." Stem Cells 20(3): 249-258.
- Hunt, G. M. (1990). "Open spina bifida: outcome for a complete cohort treated unselectively and followed into adulthood." Dev Med Child Neurol 32(2): 108-118.
- Jin, Y., J. Bouyer, et al. (2016). "Transplantation of neural progenitor cells in chronic spinal cord injury." Neuroscience 320: 69-82.
- Johnson, M. P., L. N. Sutton, et al. (2003). "Fetal myelomeningocele repair: short-term clinical outcomes." Am J Obstet Gynecol 189(2): 482-487.

- Kakishita, K., N. Nakao, et al. (2003). "Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions." Brain Res 980(1): 48-56.
- Kaviani, A., K. Guleserian, et al. (2003). "Fetal tissue engineering from amniotic fluid." J Am Coll Surg 196(4): 592-597.
- Kaviani, A., T. E. Perry, et al. (2001). "The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering." J Pediatr Surg 36(11): 1662-1665.
- Klein, J. D., C. G. Turner, et al. (2011). "Amniotic mesenchymal stem cells enhance normal fetal wound healing." Stem Cells Dev 20(6): 969-976.
- Klemmt, P. A., V. Vafaizadeh, et al. (2011). "The potential of amniotic fluid stem cells for cellular therapy and tissue engineering." Expert Opin Biol Ther 11(10): 1297-1314.
- Kohga, H. and K. Obata (1992). "Retinoic acid-induced neural tube defects with multiple canals in the chick: immunohistochemistry with monoclonal antibodies." Neurosci Res 13(3): 175-187.
- Kohl, T., R. Hering, et al. (2006). "Percutaneous fetoscopic patch coverage of spina bifida aperta in the human--early clinical experience and potential." Fetal Diagn Ther 21(2): 185-193.
- Kohl, T., K. Tchatcheva, et al. (2009). "Percutaneous fetoscopic patch closure of human spina bifida aperta: advances in fetal surgical techniques may obviate the need for early postnatal neurosurgical intervention." Surg Endosc 23(4): 890-895.
- Korenromp, M. J., J. D. van Gool, et al. (1986). "Early fetal leg movements in myelomeningocele." Lancet 1(8486): 917-918.
- Krueger, R. C., Jr., H. Wu, et al. (2006). "Neural progenitors populate the cerebrospinal fluid of preterm patients with hydrocephalus." J Pediatr 148(3): 337-340.
- Kunisaki, S. M., M. Armant, et al. (2007). "Tissue engineering from human mesenchymal amniocytes: a prelude to clinical trials." J Pediatr Surg 42(6): 974-979; discussion 979-980.
- Langer, R. and J. Vacanti (2016). "Advances in tissue engineering." J Pediatr Surg 51(1): 8-12.
- Lary, J. M. and L. D. Edmonds (1996). "Prevalence of spina bifida at birth--United States, 1983-1990: a comparison of two surveillance systems." MMWR CDC Surveill Summ 45(2): 15-26.
- Lepore, A. C. and I. Fischer (2005). "Lineage-restricted neural precursors survive, migrate, and differentiate following transplantation into the injured adult spinal cord." Exp Neurol 194(1): 230-242.
- Li, H., F. Gao, et al. (2012). "Therapeutic potential of in utero mesenchymal stem cell (MSCs) transplantation in rat fetuses with spina bifida aperta." J Cell Mol Med 16(7): 1606-1617.
- Li, H., J. Miao, et al. (2014). "Different expression patterns of growth factors in rat fetuses with spina bifida aperta after in utero mesenchymal stromal cell transplantation." Cytotherapy 16(3): 319-330.
- Li, J. and G. Lepski (2013). "Cell transplantation for spinal cord injury: a systematic review." Biomed Res Int 2013: 786475.

- Li, X., Z. Yuan, et al. (2016). "Application potential of bone marrow mesenchymal stem cell (BMSCs) based tissue-engineering for spinal cord defect repair in rat fetuses with spina bifida aperta." J Mater Sci Mater Med 27(4): 77.
- Li, Z., J. Gindler, et al. (2003). "Folic acid supplements during early pregnancy and likelihood of multiple births: a population-based cohort study." Lancet 361(9355): 380-384.
- Lins, L. C., F. Wianny, et al. (2016). "Effect of polyvinylidene fluoride electrospun fiber orientation on neural stem cell differentiation." J Biomed Mater Res B Appl Biomater.
- Liu, Z., Y. Li, et al. (2014). "Beneficial effects of gfap/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke." Glia 62(12): 2022-2033.
- Luthy, D. A., T. Wardinsky, et al. (1991). "Cesarean section before the onset of labor and subsequent motor function in infants with meningomyelocele diagnosed antenatally." N Engl J Med 324(10): 662-666.
- Ma, W., X. Wei, et al. (2015). "Sensory neuron differentiation potential of in utero mesenchymal stem cell transplantation in rat fetuses with spina bifida aperta." Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 103(9): 772-779.
- Ma, Y., Y. Bao, et al. (2012). "Correlation between spina bifida manifesta in fetal rats and c-Jun N-terminal kinase signaling." Neural Regen Res 7(32): 2485-2491.
- Magistri, M., N. Houry, et al. (2016). "A comparative transcriptomic analysis of astrocytes differentiation from human neural progenitor cells." Eur J Neurosci 44(10): 2858-2870.
- Maraldi, T., L. Bertoni, et al. (2014). "Human amniotic fluid stem cells: neural differentiation in vitro and in vivo." Cell Tissue Res 357(1): 1-13.
- Marin-Padilla, M. (1966). "Mesodermal alterations induced by hypervitaminosis A." J Embryol Exp Morphol 15(3): 261-269.
- McComb, J. G. (2015). "A practical clinical classification of spinal neural tube defects." Childs Nerv Syst 31(10): 1641-1657.
- McKay, R. (1997). "Stem cells in the central nervous system." Science 276(5309): 66-71.
- Meuli, M., C. Meuli-Simmen, et al. (1997). "The spinal cord lesion in human fetuses with myelomeningocele: implications for fetal surgery." J Pediatr Surg 32(3): 448-452.
- Meuli, M., C. Meuli-Simmen, et al. (1995). "In utero surgery rescues neurological function at birth in sheep with spina bifida." Nat Med 1(4): 342-347.
- Meuli, M., C. Meuli-Simmen, et al. (1995). "Creation of myelomeningocele in utero: a model of functional damage from spinal cord exposure in fetal sheep." J Pediatr Surg 30(7): 1028-1032; discussion 1032-1023.
- Meuli, M. and U. Moehrlen (2014). "Fetal surgery for myelomeningocele is effective: a critical look at the whys." Pediatr Surg Int 30(7): 689-697.

- Michejda, M. (1984). "Intrauterine treatment of spina bifida: primate model." Z Kinderchir 39(4): 259-261.
- Michejda, M. and D. McCollough (1987). "New animal model for the study of neural tube defects." Z Kinderchir 42 Suppl 1: 32-35.
- Mitsui, T., J. S. Shumsky, et al. (2005). "Transplantation of neuronal and glial restricted precursors into contused spinal cord improves bladder and motor functions, decreases thermal hypersensitivity, and modifies intraspinal circuitry." J Neurosci 25(42): 9624-9636.
- Mothe, A. J. and C. H. Tator (2013). "Review of transplantation of neural stem/progenitor cells for spinal cord injury." Int J Dev Neurosci 31(7): 701-713.
- Muench, M. O. and A. Barcena (2004). "Stem cell transplantation in the fetus." Cancer Control 11(2): 105-118.
- O'Brien, L. C., P. M. Keeney, et al. (2015). "Differentiation of Human Neural Stem Cells into Motor Neurons Stimulates Mitochondrial Biogenesis and Decreases Glycolytic Flux." Stem Cells Dev 24(17): 1984-1994.
- Olguner, M., F. M. Akgur, et al. (2000). "Amniotic fluid exchange for the prevention of neural tissue damage in myelomeningocele: an alternative minimally invasive method to open in utero surgery." Pediatr Neurosurg 33(5): 252-256.
- Padmanabhan, R. (2006). "Etiology, pathogenesis and prevention of neural tube defects." Congenit Anom (Kyoto) 46(2): 55-67.
- Pamir, E., D. Ali, et al. (2006). "The effects of high dose progesterone on neural tube development in early chick embryos." Neurol India 54(2): 178-181.
- Parati, E. A., S. Pozzi, et al. (2004). "Neural stem cells: an overview." J Endocrinol Invest 27(6 Suppl): 64-67.
- Patten, B. M. (1952). "Overgrowth of the neural tube in young human embryos." Anat Rec 113(4): 381-393.
- Pedreira, D. A., P. R. Valente, et al. (2003). "Successful fetal surgery for the repair of a 'myelomeningocele-like' defect created in the fetal rabbit." Fetal Diagn Ther 18(3): 201-206.
- Peiro, J. L., C. G. Fontecha, et al. (2013). "Single-Access Fetal Endoscopy (SAFE) for myelomeningocele in sheep model I: amniotic carbon dioxide gas approach." Surg Endosc 27(10): 3835-3840.
- Pennington, E. C., F. L. Gray, et al. (2013). "Targeted quantitative amniotic cell profiling: a potential diagnostic tool in the prenatal management of neural tube defects." J Pediatr Surg 48(6): 1205-1210.
- Pevny, L. H. and S. K. Nicolis (2010). "Sox2 roles in neural stem cells." Int J Biochem Cell Biol 42(3): 421-424.
- Pilowsky, P. M., A. J. Hodgson, et al. (1982). "Acetylcholinesterase in neural tube defects: a model using chick embryo amniotic fluid." Neuroscience 7(5): 1203-1214.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science 284(5411): 143-147.

- Prusa, A. R., E. Marton, et al. (2004). "Neurogenic cells in human amniotic fluid." Am J Obstet Gynecol 191(1): 309-314.
- Pruszk, J., L. Just, et al. (2009). "Isolation and culture of ventral mesencephalic precursor cells and dopaminergic neurons from rodent brains." Curr Protoc Stem Cell Biol Chapter 2: Unit 2D 5.
- Puvirajesinghe, T. M. and J. P. Borg (2015). "Neural tube defects: from a proteomic standpoint." Metabolites 5(1): 164-183.
- Quemelo, P. R., C. M. Lourenco, et al. (2007). "Teratogenic effect of retinoic acid in swiss mice." Acta Cir Bras 22(6): 451-456.
- Reubinoff, B. E., P. Itsykson, et al. (2001). "Neural progenitors from human embryonic stem cells." Nat Biotechnol 19(12): 1134-1140.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science 255(5052): 1707-1710.
- Rosner, M., K. Schipany, et al. (2012). "Amniotic fluid stem cells: future perspectives." Stem Cells Int 2012: 741810.
- Ryder, E. F., E. Y. Snyder, et al. (1990). "Establishment and characterization of multipotent neural cell lines using retrovirus vector-mediated oncogene transfer." J Neurobiol 21(2): 356-375.
- Saadai, P., Y. S. Nout, et al. (2011). "Prenatal repair of myelomeningocele with aligned nanofibrous scaffolds-a pilot study in sheep." J Pediatr Surg 46(12): 2279-2283.
- Saadai, P., A. Wang, et al. (2013). "Human induced pluripotent stem cell-derived neural crest stem cells integrate into the injured spinal cord in the fetal lamb model of myelomeningocele." J Pediatr Surg 48(1): 158-163.
- Sahab Negah, S., Z. Khaksar, et al. (2016). "Enhancement of Neural Stem Cell Survival, Proliferation, Migration, and Differentiation in a Novel Self-Assembly Peptide Nanofibber Scaffold." Mol Neurobiol.
- Sandner, B., P. Prang, et al. (2012). "Neural stem cells for spinal cord repair." Cell Tissue Res 349(1): 349-362.
- Sanluis-Verdes, A., N. Sanluis-Verdes, et al. (2016). "Tissue engineering for neurodegenerative diseases using human amniotic membrane and umbilical cord." Cell Tissue Bank.
- Schoeberlein, A., W. Holzgreve, et al. (2004). "In utero transplantation of autologous and allogeneic fetal liver stem cells in ovine fetuses." Am J Obstet Gynecol 191(3): 1030-1036.
- Shihabuddin, L. S., J. Ray, et al. (1997). "FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord." Exp Neurol 148(2): 577-586.
- Sieber-Blum, M., L. Schnell, et al. (2006). "Characterization of epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) grafts in the lesioned spinal cord." Mol Cell Neurosci 32(1-2): 67-81.
- Singh, S. P., N. K. Tripathy, et al. (2013). "Comparison of phenotypic markers and neural differentiation potential of multipotent adult progenitor cells and mesenchymal stem cells." World J Stem Cells 5(2): 53-60.

- Sival, D. A., J. H. Begeer, et al. (1997). "Perinatal motor behaviour and neurological outcome in spina bifida aperta." Early Hum Dev 50(1): 27-37.
- Skop, N. B., F. Calderon, et al. (2016). "Optimizing a multifunctional microsphere scaffold to improve neural precursor cell transplantation for traumatic brain injury repair." J Tissue Eng Regen Med 10(10): E419-E432.
- Steigman, S. A., M. Armant, et al. (2008). "Preclinical regulatory validation of a 3-stage amniotic mesenchymal stem cell manufacturing protocol." J Pediatr Surg 43(6): 1164-1169.
- Stiefel, D., A. J. Copp, et al. (2007). "Fetal spina bifida in a mouse model: loss of neural function in utero." J Neurosurg 106(3 Suppl): 213-221.
- Stottmann, R. W., J. L. Moran, et al. (2011). "Focusing forward genetics: a tripartite ENU screen for neurodevelopmental mutations in the mouse." Genetics 188(3): 615-624.
- Sutton, L. N., N. S. Adzick, et al. (1999). "Improvement in hindbrain herniation demonstrated by serial fetal magnetic resonance imaging following fetal surgery for myelomeningocele." JAMA 282(19): 1826-1831.
- Tanaka, S., Y. Kamachi, et al. (2004). "Interplay of SOX and POU factors in regulation of the Nestin gene in neural primordial cells." Mol Cell Biol 24(20): 8834-8846.
- Tian, L., M. P. Prabhakaran, et al. (2015). "Strategies for regeneration of components of nervous system: scaffolds, cells and biomolecules." Regen Biomater 2(1): 31-45.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A 76(9): 4350-4354.
- Trujillo, C. A., T. T. Schwindt, et al. (2009). "Novel perspectives of neural stem cell differentiation: from neurotransmitters to therapeutics." Cytometry A 75(1): 38-53.
- Tsai, M. S., J. L. Lee, et al. (2004). "Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol." Hum Reprod 19(6): 1450-1456.
- Tsan, Y. C., M. H. Morell, et al. (2016). "miR-410 controls adult SVZ neurogenesis by targeting neurogenic genes." Stem Cell Res 17(2): 238-247.
- Tsurubuchi, T., S. Ichi, et al. (2013). "Amniotic fluid and serum biomarkers from women with neural tube defect-affected pregnancies: a case study for myelomeningocele and anencephaly: clinical article." J Neurosurg Pediatr 12(4): 380-389.
- Tulipan, N., M. Hernanz-Schulman, et al. (1999). "Intrauterine myelomeningocele repair reverses preexisting hindbrain herniation." Pediatr Neurosurg 31(3): 137-142.
- Turner, C. G., J. D. Klein, et al. (2013). "The amniotic fluid as a source of neural stem cells in the setting of experimental neural tube defects." Stem Cells Dev 22(4): 548-553.

- Turner, C. G., E. C. Pennington, et al. (2013). "Intra-amniotic delivery of amniotic-derived neural stem cells in a syngeneic model of spina bifida." Fetal Diagn Ther 34(1): 38-43.
- Vescovi, A. L., E. A. Parati, et al. (1999). "Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation." Exp Neurol 156(1): 71-83.
- Vinci, L., A. Ravarino, et al. (2016). "Immunohistochemical markers of neural progenitor cells in the early embryonic human cerebral cortex." Eur J Histochem 60(1): 2563.
- Vishwakarma, S. K., A. Bardia, et al. (2014). "Current concept in neural regeneration research: NSCs isolation, characterization and transplantation in various neurodegenerative diseases and stroke: A review." J Adv Res 5(3): 277-294.
- Wang, A., Z. Tang, et al. (2011). "Induced pluripotent stem cells for neural tissue engineering." Biomaterials 32(22): 5023-5032.
- Watanabe, M., H. Li, et al. (2016). "Complete tissue coverage achieved by scaffold-based tissue engineering in the fetal sheep model of Myelomeningocele." Biomaterials 76: 133-143.
- Watanabe, M., H. Li, et al. (2011). "A tissue engineering approach for prenatal closure of myelomeningocele: comparison of gelatin sponge and microsphere scaffolds and bioactive protein coatings." Tissue Eng Part A 17(7-8): 1099-1110.
- Wegner, M. and C. C. Stolt (2005). "From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development." Trends Neurosci 28(11): 583-588.
- Weiss, S., C. Dunne, et al. (1996). "Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis." J Neurosci 16(23): 7599-7609.
- Weiss, S., B. A. Reynolds, et al. (1996). "Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain?" Trends Neurosci 19(9): 387-393.
- Wells, T., K. Rough, et al. (2011). "Transcription Mapping of Embryonic Rat Brain Reveals EGR-1 Induction in SOX2 Neural Progenitor Cells." Front Mol Neurosci 4: 6.
- Yandava, B. D., L. L. Billingham, et al. (1999). "'Global' cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: evidence from the dysmyelinated shiverer mouse brain." Proc Natl Acad Sci U S A 96(12): 7029-7034.
- Yi, T., D. S. Lee, et al. (2012). "Gene expression profile reveals that STAT2 is involved in the immunosuppressive function of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells." Gene 497(2): 131-139.
- Zanjani, E. D., M. G. Pallavacini, et al. (1992). "Human-ovine xenogenic transplantation of stem cells in utero." Bone Marrow Transplant 9 Suppl 1: 86-89.

- Zappaterra, M. W. and M. K. Lehtinen (2012). "The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond." Cell Mol Life Sci 69(17): 2863-2878.
- Zhang, S. C., M. Wernig, et al. (2001). "In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells." Nat Biotechnol 19(12): 1129-1133.
- Zhao, T., Q. Gan, et al. (2014). "beta-catenin regulates Pax3 and Cdx2 for caudal neural tube closure and elongation." Development 141(1): 148-157.
- Zhu, X., X. Wang, et al. (2013). "Stem cell properties and neural differentiation of sheep amniotic epithelial cells." Neural Regen Res 8(13): 1210-1219.
- Zhu, Y., A. Wang, et al. (2010). "Nanofibrous Patches for Spinal Cord Regeneration." Adv Funct Mater 20(9): 1433-1440.
- Zuk, P. A., M. Zhu, et al. (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." Mol Biol Cell 13(12): 4279-4295.