

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES
DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO Y DE MEDIOS CONDICIONADOS EN LA
RECUPERACIÓN MOTORA DE RATAS CON LESIÓN MEDULAR.**

DIANA LEANDRA NÚÑEZ RÍOS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

Bogotá, 2010

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES
DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO Y DE MEDIOS CONDICIONADOS EN LA
RECUPERACIÓN MOTORA DE RATAS CON LESIÓN MEDULAR.**

DIANA LEANDRA NÚÑEZ RÍOS

Código: 597802

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de
Magíster en Genética Humana**

Director

ORLANDO CHAPARRO GARZÓN, PhD.

Universidad Nacional

Co-Directores

ROSA MARGARITA GÓMEZ BELLO, PhD.

ALEJANDRA MARGARITA MÚÑOZ

Universidad de La Sabana

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

Bogotá, 2010

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO Y DE MEDIOS CONDICIONADOS EN LA RECUPERACIÓN MOTORA DE RATAS CON LESIÓN MEDULAR.

RESUMEN EJECUTIVO

La médula espinal al permitir la transmisión de impulsos nerviosos, favorece el movimiento en organismos cordados, por lo que un evento traumático se traduce en una disfunción neuronal con pérdida de las facultades motrices. Infortunadamente el porcentaje de regeneración espontánea es de tan solo un 1%, causando una discapacidad severa en las personas afectadas y aumentando los costos en el sistema de salud por el pago de incapacidades y manejo de la enfermedad. Las células madre mesenquimales (MSC), son consideradas como una estrategia terapéutica, no solo por su capacidad de reemplazar el tejido lesionado, sino por su efecto paracrino que favorece la supervivencia celular y disminuye los efectos secundarios ocurridos tras la lesión. Por tanto, con el objetivo de evaluar si los medios condicionados (MC) y las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hAdMSC), favorecen la recuperación motora en ratas con lesión medular, se realizó sección de la médula espinal en el segmento torácico (T8-T10) a 15 ratas Wistar libre de patógenos específicos (specific pathogen free, SPF), se administraron células, Medios Condicionados y células + Medios Condicionados, como tratamiento y se evaluó la recuperación motora con la escala Basso, Beattie y Bresnahan (BBB), realizando una caminata cada tercer día hasta completar 21. Una vez terminada la evaluación motora, se recuperó la médula espinal para hacer la valoración histopatológica del sitio lesionado. Los resultados muestran que los tratamientos con células hAdMSC, medio condicionado y células hAdMSC+MC, favorecen la recuperación motora y la supervivencia en ratas con sección medular completa. Estos resultados permiten sugerir que la recuperación observada en las ratas evaluadas, se debe al efecto paracrino de las hAdMSC y no solo a su integración y diferenciación en el tejido lesionado.

Palabras clave: Médula espinal, lesión medular, células madre mesenquimales, medio condicionado, escala motora de BBB.

EFFECT OF MESENCHYMALS STEM CELLS DERIVED FROM HUMAN ADIPOSE TISSUE AND CONDITIONED MEDIUM IN MOTOR RECOVERY OF RATS WITH SPINAL CORD INJURY.

Abstract

The spinal cord permitting the transmission of nerve impulses, favors the movement in chordate organism, so that a traumatic event results in neuronal dysfunction with loss of motor faculties. Unfortunately, the percentage of spontaneous regeneration is only about 1%, causing severe disability in affected persons and increasing costs in health system by the payment of disability and disease management. Mesenchymals stem cells (MSC) are considered a therapeutic option not only for their ability to replace damage tissue, but because of their paracrine effect that favors cell survival and reduces the secondary effects that occur after injury. Therefore, in order to assess whether conditioned medium (CM) and mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue (hAdMSC) foster motor recovery in rats with spinal cord injury, spinal cord sections at the thoracic segment (T8-T10) was performed in 15 specific pathogen free (SPF) Wistar rats, and then the animals were treated with a) MSCs, b) conditioned medium and c) MSCs + conditioned medium and motor recuperation was evaluated the with the scale of Basso, Beattie and Bresnahan (BBB), making a walk every other day for a total of 21 walks. Histopathological analysis of the injured tissue was performed. The results show that treatment with hAdMSC, conditioned medium and hAdMSC + CM, promoted motor recovery and survival in rats with complete spinal cord section. These results suggest that observed recovery in evaluated rats, is due to paracrine effect of the hAdMSC and not only to their integration and differentiation in the injured tissue.

Keywords: Spinal cord, spinal cord injury, mesenchymals stem cells, medium conditioned, BBB score.

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo arduo y lleno de dificultades, no puedo dejar de agradecer a las personas e instituciones que me colaboraron directa e indirectamente, leyendo, opinando, corrigiendo, dándome ánimo y acompañándome en los momentos de crisis y felicidad.

Debo agradecer de manera especial y sincera al profesor Orlando Chaparro Garzón, por permitirme realizar mi tesis de Maestría bajo su dirección, guiándome no solo en el desarrollo de este trabajo sino en mi formación como persona e investigadora. Le agradezco también, el haberme facilitado los medios suficientes para llevar a cabo el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a las Doctoras Rosa Margarita Gómez y Alejandra Margarita Muñoz, de la Universidad de La Sabana, por su colaboración y por permitirme desarrollar esta tesis en su laboratorio, compartiendo conmigo su experiencia y conocimiento con el manejo de animales SPF y evaluación de la recuperación motora.

Agradezco a la Universidad Nacional por admitirme y formarme en el área de Genética Humana, brindándome un apoyo importante en el transcurso de estos cuatro años.

Agradezco a la Universidad de La Sabana, por permitirme presentar el proyecto y desarrollarlo en sus instalaciones.

En el campo personal debo dar mi más sentido y profundo agradecimiento, principalmente a Dios por llenar mi vida de dichas y bendiciones; a mis hermosos padres Helena y Eduardo y a mi hermanita bella Heidi, por su apoyo, colaboración, paciencia, consejos y ejemplo de lucha y honestidad y finalmente a Wilder que desde un principio hasta el día de hoy sigue brindándome animo, cariño y confianza para terminar este proceso.

Gracias también a mis queridos compañeros del grupo “Biología de Células Madre” de la universidad Nacional, Orietta, Adriana, Itali, Ximena, Lida y Rafael, por sus consejos, enseñanza y colaboración.

Agradezco de manera especial a mis compañeros, Yaqui, Schyrly, Carolina, Claudia, María E. y Martha, con quienes inicié este proceso de Maestría y compartí experiencias inolvidables dentro y fuera del salón de clase. A Diana Q., Edwin y Elver, quienes también me acompañaron en este proceso.

Agradezco también a Islena por su amistad, paciencia y ayuda en todos los momentos de dificultad académica y al Dr. Alejandro Giraldo y las Dras. Clarita, Indiana, Cristina y Sandra, quienes me brindaron su apoyo y colaboración el tiempo que compartí con ellos.

Agradezco de manera especial a Jaqueline Niño, estudiante de Fisioterapia de la Universidad de La Sabana por su amistad y colaboración en el proceso de evaluación motora de las ratas y a la Dra Martha Acosta por su colaboración, consejos y apoyo durante este proceso.

Agradezco también de manera especial a la Dra. Lucia Botero, Patóloga de la Universidad Nacional por su colaboración en el proceso de evaluación histológica de las médulas.

Finalmente agradezco a mis compañeros del Instituto Nacional de Cancerología, Schyrly, Carolina, Oscar, Andrés, Dr Pablo y Dra Mónica, por permitirme trabajar con ustedes y a la par desarrollar esta tesis y de manera especial agradezco también a la Dra Teresa Martínez por toda su colaboración en la parte estadística de este trabajo.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO Y DE MEDIOS CONDICIONADOS EN LA RECUPERACIÓN MOTORA DE RATAS CON LESIÓN MEDULAR..... 1

1. INTRODUCCIÓN	14
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	15
3. SITUACIÓN ACTUAL DEL CONOCIMIENTO	18
4. MARCO TEÓRICO.....	21
4.1 Fisiología de la médula espinal.....	21
4.2 Lesión de médula espinal	22
4.2.1 Formación de la cavidad necrótica.....	22
4.2.2 Formación de la cicatriz glial:	23
4.2.3 Barreras de Regeneración	24
4.3 Complicaciones de la lesión medular en modelos animales.....	24
4.4 Evaluación de la recuperación motora en ratas	25
4.5 Células madre.....	25
4.5.1 Células madre mesenquimales (MSC):.....	25
4.5.2 Efecto paracrino	26
4.5.3 Efecto inmunomodulador	27
4.6 Células madre mesenquimales y regeneración medular	28
4.7 Factores de crecimiento y regeneración medular	29
4.7.1 Factores neurotróficos.....	29
4.7.2. Factores de crecimiento	29
4.7.3. Citoquinas	29
5. OBJETIVOS	30
5.1 Objetivo general.....	30
5.2 Objetivos específicos	30
6. MARCO METODOLÓGICO	31
6.1 Tipo de estudio	31
6.2 Población	31
6.3 Sitio de la investigación	31
6.4 Diseño muestral	31
6.5 Métodos	32
6.5.1 Cultivo celular y obtención de los medios condicionados:.....	32
Cultivo celular.....	32
Obtención de medio condicionado	32
Preparación de células para trasplante	33

Preparación de la matriz de fibrina	33
6.5.2 Procedimiento Quirúrgico y cuidado animal	33
6.5.3 Tratamiento	34
Grupo 1:	34
Grupo 2:	34
Grupo 3	34
Grupo 4	35
Grupo 5	35
6.5.4 Análisis de recuperación motora	35
6.5.5 Eutanasia	36
6.5.6 Histología	36
6.5.7 Inmunohistoquímica:	36
7. RESULTADOS	37
7.1 Supervivencia	37
7.2 Recuperación motora.....	40
7.3 Evaluación Histopatológica.....	42
7.4. Evaluación inmunohistoquímica:	45
8. DISCUSIÓN	46
9. CONCLUSIONES.....	53
10. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	54
11. BIBLIOGRAFIA	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la Médula espinal. Modificado de Thuret, S. *et al.* 2006. La médula espinal esta compuesta por materia gris y materia blanca, en la que se encuentran las fibras nerviosas que permiten la transmisión de los impulsos nerviosos por vías aferentes y eferentes.....8

Figura 2. Formación de la cicatriz glial en la médula espinal. La cicatriz glial se compone principalmente de astrocitos reactivos que liberan proteoglicanos condroitin sulfato, los cuales ingresan a los cuerpos axonales y alteran la estructura citoesquelética. Esquema realizado por Diana Núñez basado en el artículo de Rolls, A.; Shechter, R. and Schwartz, M. 2009.10

Figura 3. Esquema de obtención de un medio condicionado. Las MSC gracias a su efecto paracrino, secreta factores de crecimiento y moléculas de señalización al medio que utiliza para su crecimiento. De esta manera tras un cultivo in Vitro se puede obtener el medio condicionado enriquecido con las proteínas secretadas por las MSC.....14

Figura 4. Análisis de supervivencia por Kaplan-Meier. La gráfica representa el tiempo de sobrevivencia de las ratas con sección medular completa. Las cruces representan los casos censurados, es decir, las ratas que fueron sacrificadas después de terminar el tiempo de estudio26

Figura 5. Variación del peso corporal durante el tiempo de evaluación. Las gráficas representan el cambio de peso corporal en las ratas evaluadas con sección medular completa.....26

Figura 6. Recuperación motora de las ratas con lesión completa. a. Gráfica general comparando los puntajes promedio de cada grupo durante el tiempo de evaluación; b. Gráfica de comparación de los puntajes de ratas tratadas con células Vs Control de lesión completa; c. Gráfica de comparación de los

puntajes de ratas tratadas con MC Vs Control de lesión completa; d. Gráfica de comparación de los puntajes de ratas tratadas con células + MC Vs Control de lesión completa.....29

Figura 7. Evaluación histopatológica de la médula espinal de ratas tratadas con hAdMSC. A) Se observa una aparente reconexión (flechas) con pequeñas cavidades (cabezas de flecha). H.E. 40X. B) Con un mayor aumento se observan las cavidades pequeñas (flechas) con presencia de células vacuoladas (cabezas de flecha). H.E. 200X. C) Detalle de la foto anterior donde se evidencian claramente células vacuoladas con núcleos periféricos (flechas). H.E. 400X. D) Fotografía de una médula espinal como control de la lesión, sin observar unión de los fragmentos extremos medulares H.E. 200X.....30

Figura 8. Evaluación histopatológica de la médula espinal de ratas tratadas con medio condicionado. A) Se observa focos de aparente reconexión (flechas) con cavidades de mayor tamaño (cabezas de flecha). H.E. 40X B) Detalle de las cavidades mayores (cabezas de flecha). H.E. C) Se evidencian células alargadas de núcleos alargados (flechas). H.E. 400X.....31

Figura 9. Evaluación histopatológica de la médula espinal de ratas tratadas con hAdMSC y medio condicionado. A) Se observa aparente reconexión medular con alta celularidad en el área (flechas). H.E. 40X B) Detalle de la anterior, donde se aprecia la alta celularidad (flecha). H.E. 200X. C) Se evidencian las células vacuoladas de núcleos periféricos (flechas) con células alargadas de núcleos alargados (cabezas de flecha). H.E. 400X aprox.....32

Figura 10. Inmunomarcador S-100 en cortes histológicos de la lesión medular. A) Se aprecian los extremos de la médula espinal (cabezas de flecha) y el área de la lesión con aparente reconexión y marcación positiva para S-100 (flechas) 40X. B) Con el aumento 200X se observa tinción positiva en el área de la lesión, que se muestra a manera de fibras (flechas). 200X. C) Detalle de la foto anterior donde se evidencian claramente las fibras S-100 positivas (flechas) 400X. D). Control negativo de S-100.....33

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Descripción general de las ratas evaluadas. En esta tabla se describe el número de ratas por grupo de tratamiento y el puntaje máximo obtenido con la escala BBB para la evaluación motora.....24

Tabla 2. Supervivencia general de las ratas con lesión completa. Tabla A, muestra el número de ratas por tratamiento que fallecieron durante el tiempo de evaluación. Tabla B, muestra el número de ratas por tratamiento que fueron sacrificadas luego de completar el tiempo de estudio.....25

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Escala BBB

ANEXO 2. Vía señalización HGF

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO Y DE MEDIOS CONDICIONADOS EN LA RECUPERACIÓN MOTORA DE RATAS CON LESIÓN MEDULAR

1. INTRODUCCIÓN

La lesión de la médula espinal, considerada como un problema neurológico no regenerativo, desencadena una serie de eventos patológicos que conllevan a una respuesta inflamatoria, seguida de una alteración en la matriz extracelular, con formación de la cicatriz glial y liberación de factores inhibidores de mielina (Deumens, R. *et al.* 2005). Como consecuencia, se establece un ambiente hostil para la regeneración de cuerpos axonales y un déficit de factores de crecimiento, que evitan la formación de nuevas conexiones neuronales (Raineteau, O. 2008). No obstante, la plasticidad espontánea ha sido documentada en lesiones medulares incompletas y en modelos experimentales neonatales, refiriéndose a reconexiones incompletas sujetas a cambio, en sitios diferentes al de la lesión (Gorska, T. *et al.* 2009; Kikukawa, S. *et al.* 1998; Murray, M. *et al.* 2004; Raineteau, O. 2008; Tillakaratne, N. J. *et al.* 2010).

Como alternativa terapéutica para crear un microambiente favorable que permita la recuperación de lesiones neuronales, se postula el uso de las hAdMSC, no solo por su capacidad de integrarse y diferenciarse en el tejido lesionado, sino por su capacidad de secretar factores de crecimiento y factores angiogénicos al medio externo (Kang, S. K. *et al.* 2007; Mareschi, K. *et al.* 2006; Mezey, E. *et al.* 2003; Miller, R. H. *et al.* 2010; Tyndall, A. and Uccelli, A. 2009; Uccelli, A. *et al.* 2006). Así mismo, las AdMSC debido a su efecto paracrino, secretan citoquinas y factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de hepatocitos (Hepatocyte Growth Factor, HGF), el factor neurotrófico derivado de cerebro (Brain Derive Neurotrophic Factor, BDNF), el factor de crecimiento vasculoendotelial (Vascular

Endotelial Factor Growth Factor, VEGF) y la interleuquina 6 (Interleukin, IL6), los cuales activan las vías PI3K y MAPK de supervivencia celular, reducen la activación de vías proapoptóticas, promueven el crecimiento de vasos sanguíneos, modulan la respuesta inflamatoria y favorecen la migración de células neuronales al sitio de la lesión (Chen, Z. L. *et al.* 2007; Kang, S. K. *et al.* 2007; Massey, J. M. *et al.* 2008; Oudega, M. and Hagg, T. 1999; Willerth, S. M. and Sakiyama-Elbert, S. E. 2008).

En Colombia, el grupo de investigación Biología de Células Madre de la Universidad Nacional, mediante una RT-PCR y un arreglo de proteínas, ha demostrado la presencia de factores proangiogénicos e inmunomoduladores como HGF, BDNF, VEGF, SDF-1, TGF- α y β FGF entre otros, que promueven la migración, proliferación y supervivencia celular (Beltrán, O. 2007; Jain, A. *et al.* 2006; Mansilla, E. *et al.* 2005; Restrepo, S. 2009). Por otra parte, el grupo de Neurociencias de la Universidad de La Sabana, ha demostrado la recuperación motora de ratas Wistar SPF, con sección medular, utilizando una combinación de factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF) con la goma de fibrina (*fibrin glue* - FG) y células de la glía envolvente olfatoria (CGEO) en suspensión.

Por tanto, basados en estos resultados, el presente trabajo utilizó un modelo de lesión medular *in vivo*, para determinar si son las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hAdMSC) o los medios condicionados los que favorecen una recuperación funcional locomotora.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La médula espinal, al formar parte del sistema nervioso central, entre sus múltiples funciones permite la transmisión del impulso nervioso de forma ascendente y descendente, y con ello el movimiento en organismos cordados (Siegel, G. *et al.* 1999). Al generarse una lesión en esta área, se desencadenan mecanismos patológicos como alteración vascular, desregulación iónica y osmótica y formación

de barreras de regeneración, que modifican completamente la estructura de dicha región (Bauchet, L. *et al.* 2008; Dietz, V. and Curt, A. 2006; Fawcett, J. W. and Asher, R. A. 1999; Massey, J. M. *et al.* 2008).

Las lesiones medulares causadas generalmente por eventos traumáticos, constituyen una entidad discapacitante, que afecta personas jóvenes entre los 15 y los 28 años, con una incidencia mundial de 40 - 80 nuevos casos por un millón de habitantes y un costo de vida aproximado de 3.5 billones de dólares anuales por persona (Bauchet, L. *et al.* 2008; Sedy, J. *et al.* 2008; Thuret, S. *et al.* 2006). En Colombia, según el reporte entregado por la red de solidaridad social en el año 2005, se observa que el porcentaje de personas discapacitadas con trastornos funcionales crónicos ocupa un 9.7%, grupo en el que se encuentran las personas con lesiones medulares, alcanzando una incidencia de 20-40 nuevos casos por millón de habitantes. El género más afectado es el masculino, siendo cuatro veces mas frecuente que en mujeres, con edades promedio de 29 años y cuyas causas principales son actos violentos, accidentes de transito y caídas (Rodríguez, S 2002).

La recuperación espontánea ha sido documentada en modelos experimentales con sección medular incompleta, alcanzando incluso a soportar el peso y coordinar los movimientos (Gorska, T. *et al.* 2009). Por el contrario en lesiones de mayor proporción, el tratamiento no curativo más conocido, es el uso de corticoides para reducir la inflamación y demás daños presentes en la fase aguda de la lesión y tratamiento del dolor y de infecciones oportunistas para estadios crónicos. Una alternativa terapéutica postulada en los últimos años, es el uso de células madre que permitan la recuperación del tejido lesionado y con ello la recuperación funcional (Cummings, B. J. *et al.* 2005; Gómez, R. 2008; Kim, S. and Kwak, H. 2007; Ko, J. *et al.* 2006; Mansilla, E. *et al.* 2005). Las hAdMSC cumplen con características importantes para favorecer este proceso, como es su fácil obtención, capacidad de crecer en cultivo, integración con el tejido lesionado, supervivencia a largo tiempo y compatibilidad inmunológica (Yang, C. C. *et al.*

2008). Específicamente en lesiones medulares, las hAdMSC previenen la muerte celular generada por mecanismos secundarios, reducen la formación de la cicatriz glial y favorecen el reestablecimiento de conexiones neuronales funcionales (Mareschi, K. *et al.* 2006). Algunos autores postulan que este efecto es proporcionado gracias a la diferenciación de estas células inmaduras en células específicas del linaje neuronal (Mareschi, K. *et al.* 2006; Mezey, E. *et al.* 2003). Por el contrario, autores como Shen, J. *et al.* 2009 y Yang, C. C. *et al.* 2008, coinciden en que a pesar de la integración, distribución y supervivencia por aproximadamente cuatro meses de las células madre mesenquimales en el tejido lesionado, es su efecto paracrino lo que permite la recuperación funcional, a través de la liberación de factores de crecimiento, citoquinas y moléculas de señalización, que permiten la supervivencia de neuronas motoras y sensoriales por activación de las vías PI3K y MAPK, participan como agentes quimioattractantes de células nerviosas, favorecen el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y atenúan la llegada de astrocitos reactivos al sitio de la lesión y con ello la liberación de proteoglicanos condroitina sulfato (CSPG) (Chen, Z. L. *et al.* 2007; Kang, S. K. *et al.* 2007; Massey, J. M. *et al.* 2008; Oudega, M. and Hagg, T. 1999; Willerth, S. M. and Sakiyama-Elbert, S. E. 2008). Este efecto paracrino de las hAdMSC, experimentalmente puede ser aprovechado para obtener fácilmente medios condicionados, que aplicados a una lesión medular con el uso de matrices del complejo extracelular, permitirían la concentración de factores de crecimiento e interleuquinas en el sitio de la lesión y brindarían un soporte para el crecimiento de neurofilamentos (Jain, A. *et al.* 2006; Mansilla, E. *et al.* 2005).

En Colombia se han obtenido resultados promisorios; es así como el grupo de Neurociencias, de la Facultad de Medicina, de la Universidad de La Sabana (Gómez, R. 2008), ha obtenido una mejoría significativa en la función motora de ratas con lesión medular completa al alcanzar un puntaje de 12 en la escala motora de Basso, Beattie y Bresnahan (Basso, D. M. *et al.* 1995; Basso, D. M. *et al.* 1996), utilizando una combinación de factor de crecimiento fibroblástico ácido

(aFGF) con la goma de fibrina (*fibrin glue* - FG) y células de la glía envolvente olfatoria (CGEO) en suspensión. Por otro lado, estudios previos realizados por el grupo de investigación Biología de Células Madre, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional, han demostrado que las hAdMSC, secretan diversos factores de crecimiento como HGF, BDNF, VEGF, SDF-1, TGF- α y bFGF, entre otros, involucrados en procesos de neovascularización, proliferación y supervivencia neuronal, al actuar como factores neurotróficos y neuroprotectores (Beltrán, O. 2007; Restrepo, S. 2009)

De la interacción de los grupos mencionados, surge la posibilidad de evaluar el efecto de los medios condicionados y/o de las hAdMSC, en la recuperación funcional locomotora de ratas Wistar SPF con sección medular, contribuyendo al desarrollo de protocolos experimentales en búsqueda de un tratamiento eficaz para lesiones del sistema nervioso.

3. SITUACIÓN ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

El cumplimiento de las funciones motoras y sensoriales en el ser humano, está liderado principalmente por el sistema nervioso, al transmitir la información y activar mecanismos musculares a través de las células nerviosas y la matriz extracelular (Siegel, G. *et al.* 1999). Al ocurrir una lesión en la médula espinal, se genera una respuesta inflamatoria que promueve la migración de macrófagos y astrocitos reactivos, llevando a la formación de la cicatriz glial, considerada como el mayor impedimento de la regeneración espontánea (Windle, W. F. and Chambers, W. W. 1950). Por tanto al pensar en una alternativa terapéutica, es importante proporcionar células precursoras del linaje neuronal y moléculas de señalización, que reduzcan la excitotoxicidad, producción de radicales libres y presencia de sustancias neurodegenerativas que conllevan a muerte celular (Fitch, M. T. and Silver, J. 2008; Massey, J. M. *et al.* 2008; Terayama, R. *et al.* 2007).

Entendiendo la respuesta del organismo a esta lesión, se han desarrollado investigaciones que postulan nuevas vías terapéuticas, como el uso de las células madre que favorecen la regeneración de dicho tejido. Así lo expone Brazelton, *et al.*, 2000 y Mezey *et al.*, 2003, al demostrar que las células madre mesenquimales son capaces de diferenciarse a linaje neuronal. En cuanto a las hAdMSC, se ha demostrado que favorecen la recuperación funcional al formar neuroesferas, expresar marcadores característicos de este linaje (Yang, L. Y. *et al.* 2004) y actuar como precursores de oligodendrocitos, contrarrestando así la demielinización (Kang, S. K. *et al.* 2006).

Un tema importante que se debate en la comunidad científica, es la verdadera diferenciación de las AdMSC a células neuronales, por lo que se requiere demostrar la expresión de marcadores de diferenciación y actividad neuronal funcional, como lo realizaron Mareschi *et al.* (2006), al evidenciar la presencia de canales de potasio funcionales, característica importante en la despolarización de la neurona y la transmisión del impulso nervioso (Levy, Y. S. *et al.* 2003). Con trabajos realizados en modelos animales, tras la inyección de células madre diferenciadas a linajes neuronales, se ha observado un reestablecimiento de las actividades motoras, aumentando así la expectativa de uso en el tratamiento de estas lesiones (Cummings, B. J. *et al.* 2005; Gómez, R. 2008; Kim, S. and Kwak, H. 2007; Ko, J. *et al.* 2006; Mansilla, E. *et al.* 2005).

Nuestro país no ha sido ajeno a ésta búsqueda, ya que el grupo de Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Sabana, recientemente ha obtenido resultados prometedores (Gómez, R. 2008) con la aplicación de una combinación de Factor de Crecimiento Fibroblástico Ácido (aFGF), Goma de Fibrina (GF) y Células de la Glía Envoltante Olfatoria (CGEO) en suspensión, a ratas Wistar SPF (Specific Pathogen Free) con lesión medular completa aguda.

En la actualidad, dentro de las moléculas involucradas en la regeneración nerviosa que han sido postuladas por diversos reportes en la literatura, están los factores

neurotróficos como el factor de crecimiento del nervio (NGF), la neurotrofina 3 (NT-3), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), la IL-6, el factor inhibidor de leucemia, la laminina, el activador de plasminógeno (Willerth, S. M. and Sakiyama-Elbert, S. E. 2008), el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) (Kang, S. K. *et al.* 2006), el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) (Pan, W. *et al.* 2006) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Rao, M. S. *et al.* 1998). En estudios realizados por nuestro grupo de investigación, se ha comprobado que las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano, en condiciones de normoxia e hipoxia secretan β FGF, HIF, 1α VEGF, TGF β 1, PDGF- α , Ang-1, IL-1, IL-6, IL-15, BDNF, HGF, Ang-2 y TGF α -3 (Beltrán, O. 2007; Quintero, L. *et al.* 2007), siendo importante el BDNF y el HGF, ya que potencialmente podrían favorecer la regeneración medular. BDNF se considera un poderoso modulador de la excitabilidad neuronal y transmisión sináptica (Gomez-Pinilla, F. *et al.* 2007), además de promover la regeneración axonal, el crecimiento y supervivencia neuronal en lesiones medulares (Blits, B. *et al.* 2003; Dougherty, K. D. *et al.* 2000). El factor de crecimiento de los hepatocitos al encontrarse expresado en neuronas de la raíz del ganglio dorsal (Hashimoto, N. *et al.* 2001), puede favorecer la transmisión sensorial, incrementar la densidad capilar en la materia gris, disminuir el edema espinal (Shi, E. *et al.* 2006) y atenuar el daño neurológico, reduciendo la muerte celular inducida por isquemia (Pan, W. *et al.* 2006). Aunque no se discuten específicamente cuales son los factores que pueden favorecer la regeneración / reparación de la médula espinal, en el estudio realizado por Kang *et al.*, en el 2007 se demuestra que los extractos celulares de las AdMSC ejercen un efecto protector en la degeneración medular, al disminuir la expresión de moléculas pro-apoptóticas.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Fisiología de la médula espinal

La médula espinal ubicada en el canal vertebral desde la base del cerebro hasta la región lumbar, esta conformada por millones de fibras nerviosas que permiten la transmisión de impulsos nerviosos y con ello la generación de respuestas autónomas y adaptativas, que favorecen el control de todas las regiones del organismo. En un corte transversal de la médula espinal se observa una estructura en forma de H llamada sustancia gris y una región periférica denominada sustancia blanca.

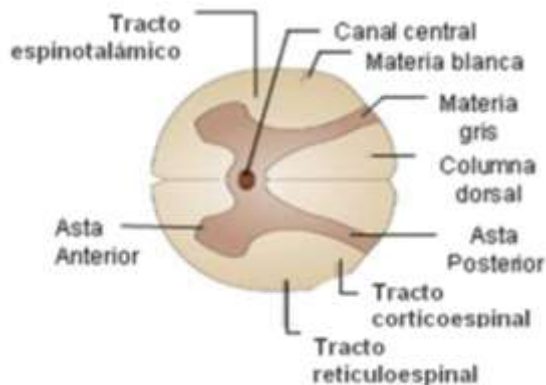


Figura 1. Estructura de la Médula espinal. Modificado de Thuret, S. *et al.* 2006. La médula espinal esta compuesta por materia gris y materia blanca, en la que se encuentran las fibras nerviosas que permiten la transmisión de los impulsos nerviosos por vías aferentes y eferentes.

La sustancia ó materia gris esta constituida por neuronas motoras que atraviesan las astas anteriores y por neuronas sensitivas que cruzan a través de las astas posteriores. La sustancia blanca esta formada por tres niveles segmentarios que facilitan el desarrollo de actividades reflejas y actividades medulares coordinadas por los centros encefálicos. Gracias a esta arquitectura de la médula espinal, se generan respuestas involuntarias de manera conciente o inconciente tras un

estimulo particular, recibiendo así el nombre de reflejo. La base anatómica de este proceso es el arco reflejo en el cual participan un órgano receptor, una neurona aferente, una neurona eferente y un órgano efector, teniendo como función el mantenimiento del tono muscular y con ello la postura corporal. Además de cumplir estas funciones, gracias a la presencia de los tractos rubroespinales, reticuloespinales y vestibuloespinales se desarrolla la respuesta motora gruesa y por medio de los tractos rafeespinal y coeruleoespinal la ejecución de movimientos finos (Figura 1). De igual manera, dicha organización favorece el procesamiento de la información sensorial propioceptiva, kinestesia, exterocepción e interocepción las cuales determinan el reconocimiento y posición del cuerpo, movimientos conscientes y sensaciones externas e internas como tacto, presión y dolor. Es así que al generarse una lesión en esta área, puede presentarse la recuperación de funciones motoras, gracias al recrecimiento de las fibras corticoespinales y rubroespinales, que puede ser potenciado por la acción de factores neurotróficos y factores de crecimiento (Menei, P. *et al.* 1998).

4.2 Lesión de médula espinal

Al perderse la arquitectura de la médula espinal, se presentan cambios moleculares y celulares que conllevan a daño neurológico permanente. A continuación se menciona de manera detallada los mecanismos primarios y secundarios ocurridos tras una lesión medular.

4.2.1 Formación de la cavidad necrótica: Proceso desencadenado en las primeras horas tras la lesión medular, debido a un impacto traumático en las estructuras que recubren la médula espinal. Se caracteriza por la ruptura de vasos sanguíneos que conlleva a microhemorragias con respuesta inflamatoria, formación de edema y desregulación iónica, ocupando el espacio del canal medular y causando muerte celular por isquemia (Dietz, V. and Curt, A. 2006; Fawcett, J. W. and Asher, R. A. 1999; Willerth, S. M. and Sakiyama-Elbert, S. E. 2008).

4.2.2 Formación de la cicatriz glial: Este proceso considerado como la principal barrera de la regeneración medular es el resultado de una continuidad y severidad de la respuesta inflamatoria desencadenada en las primeras horas de la lesión medular. Inicia con la liberación de electrolitos que complican la isquemia y bloquea la transmisión del impulso nervioso. Este proceso a su vez favorece la liberación de radicales libres y acumulación de neurotransmisores excitatorios conllevando a muerte celular programada. Finalmente hay migración de macrófagos, precursores de oligodendrocitos y células meníngeas que forman la cicatriz glial rica en astrocitos reactivos (Figura 2). Estos últimos secretan moléculas inhibitorias a la matriz extracelular como proteoglicanos condroitin sulfato (CSPGs), que ingresan a los cuerpos axonales mediante receptores, activan la vía RhoA y alteran la estructura citoesquelética. Otra consecuencia del ingreso de los CSPGs en el interior celular es el aumento del flujo de calcio que genera acidosis, activa proteasas y lipasas, afecta la función mitocondrial y con ello, promueve la liberación de la citocromo-c oxidasa, que permitirá la activación de las caspasas y llevará a la célula a muerte celular programada (Busch, S. A. and Silver, J. 2007; Massey, J. M. *et al.* 2008; Smith-Thomas, L. C. *et al.* 1995).

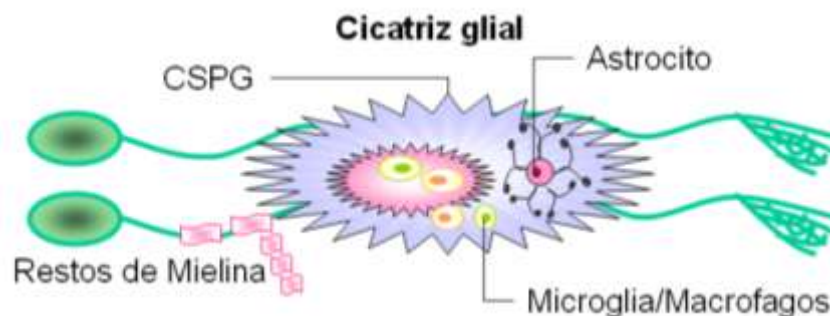


Figura 2. Formación de la cicatriz glial en la médula espinal. La cicatriz glial se compone principalmente de astrocitos reactivos que liberan proteoglicanos condroitin sulfato, los cuales ingresan a los cuerpos axonales y alteran la estructura citoesquelética. Esquema realizado por Diana Núñez basado en el artículo de Rolls, A.; Shechter, R. and Schwartz, M. 2009.

4.2.3 Barreras de Regeneración: Además de los procesos mencionados anteriormente, tras una lesión medular, la limitada capacidad del sistema nervioso central para permitir el recrecimiento o reconexión de los cuerpos neuronales, se debe a la ausencia de factores de crecimiento y a la secreción de los inhibidores Nogo, glicoproteína de mielina (MAG), glicoproteína oligodendrocito mielina (OMgp) y tenascina, que a través del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF), ingresan al interior de la neurona y llevan a muerte celular por activación de la vía RhoA y aumento en el flujo de calcio intracelular (Willerth, S. M. and Sakiyama-Elbert, S. E. 2008).

4.3 Complicaciones de la lesión medular en modelos animales

La lesión medular a nivel torácico, dependiendo de la gravedad del daño, impide la transmisión de los impulsos nerviosos que regulan la ejecución del movimiento y controlan la contracción y relajación de los músculos de la vejiga y la región abdominal (Gondim, F. A. *et al.* 1998; Hong, C. and Henderson, F. 1989; Medeiros, B. A. *et al.* 2008). En diferentes modelos experimentales, al realizar una sección completa de la médula espinal en T8 - T10, se genera una disminución del tránsito intestinal que puede resultar en peritonitis (Gondim, F. A. *et al.* 1998; Kabatas, S. *et al.* 2008; Medeiros, B. A. *et al.* 2008) y una alteración de la función renal que favorece el desarrollo de la vejiga neurogénica y con ello retención urinaria, infecciones a repetición e incluso ruptura vesical (Hong, C. and Henderson, F. 1989; Iijima, K. *et al.* 2009; Leung, P. Y. *et al.* 2007). Además de presentarse estas complicaciones post-quirúrgicas, la distensión urinaria y abdominal, promueven el aumento de los reflejos parasimpáticos que conlleva a contracciones involuntarias de los miembros posteriores e hipertensión arterial (Gondim, F. A. *et al.* 1998; Guest, J. D. *et al.* 2008).

4.4 Evaluación de la recuperación motora en ratas

Escala motora de Basso, Beattie y Bresnahan (Basso, D. M. *et al.* 1995; Basso, D. M. *et al.* 1996): Es la herramienta más utilizada en la evaluación de la función locomotora en ratas, prediciendo la extensión del daño o determinando el nivel de recuperación luego de un tratamiento. Maneja un puntaje de 0 a 21, donde 0-7 indica el retorno de movimientos aislados de cadera, rodilla y tobillos considerado como un nivel de recuperación inicial, de 8-13 movimientos coordinados con los miembros anteriores, y de 14-21 retorno de movimiento de los dedos del pie y estabilidad de tronco y cola (Ver anexo 1). Este análisis se realiza en superficies no deslizantes capaces de revelar las características del movimiento, algunos investigadores adicionalmente registran con cámaras de video las caminatas permitiendo su posterior verificación (Barros Filho, T. E. and Molina, A. E. 2008; Sedy, J. *et al.* 2008). El puntaje se asigna a cada miembro por separado (miembro posterior izquierdo -mpi- y miembro posterior derecho -mpd-) según el movimiento logrado y se promedian los dos valores, obteniendo así un puntaje final.

4.5 Células madre

Una célula madre se puede definir como una célula progenitora no especializada, autorenovable, con capacidad de dividirse indefinidamente y dar origen a células especializadas. Se clasifican según su capacidad de diferenciación en totipotentes, pluripotentes y multipotentes y según su origen en células embrionarias y células madre adultas (de Kretser, D. 2007; Kern, S. *et al.* 2006; Mimeault, M. and Batra, S. K. 2006).

4.5.1 Células madre mesenquimales (MSC): Son células madre multipotentes de adulto, que según la sociedad internacional de terapia celular, deben ser adherentes al plástico en cultivo, expresar marcadores como CD105, CD73 y CD90 y ser capaz de diferenciarse *in vitro* a linaje condrogénico, adipogénico y osteogénico. Las MSC pueden estar presentes en múltiples tejidos del organismo,

sin embargo son aisladas principalmente de médula ósea, cordón umbilical y tejido adiposo (Vats, A. *et al.* 2002). Las AdMSC tienen una mayor capacidad de proliferación y son fácilmente obtenidas de un lipoaspirado. A nivel clínico han sido utilizadas en el tratamiento de lesiones cardíacas y en la recuperación tisular de regiones isquémicas gracias a su capacidad de liberar factores angiogénicos y antiapoptóticos (Chen, S. L. *et al.* 2004; Matsumoto, R. *et al.* 2005).

4.5.2 Efecto paracrino: La capacidad reparadora de las MSC en tejidos lesionados, ha sido atribuida principalmente a su implantación y diferenciación celular (Mareschi, K. *et al.* 2006; Mezey, E. *et al.* 2003). Recientes trabajos sugieren un mecanismo alternativo de reparación denominado efecto paracrino, el cual postula que los factores de crecimiento, factores neurotróficos, citoquinas y moléculas de señalización secretadas por las MSC, son suficientes para ejercer efectos terapéuticos al activar vías que promueven la angiogenesis y regeneración tisular e inhibir la fibrosis, apoptosis e inflamación (Chen, L. *et al.* 2008; Patel, K. M. *et al.* 2007; van Poll, D. *et al.* 2008; Walter, M. N. *et al.* 2010). Gracias a esta propiedad de las MSC, a nivel experimental se obtiene el *Medio Condicionado* enriquecido con factores de crecimiento y moléculas de señalización secretados por estas células *in vitro* (Figura 3).

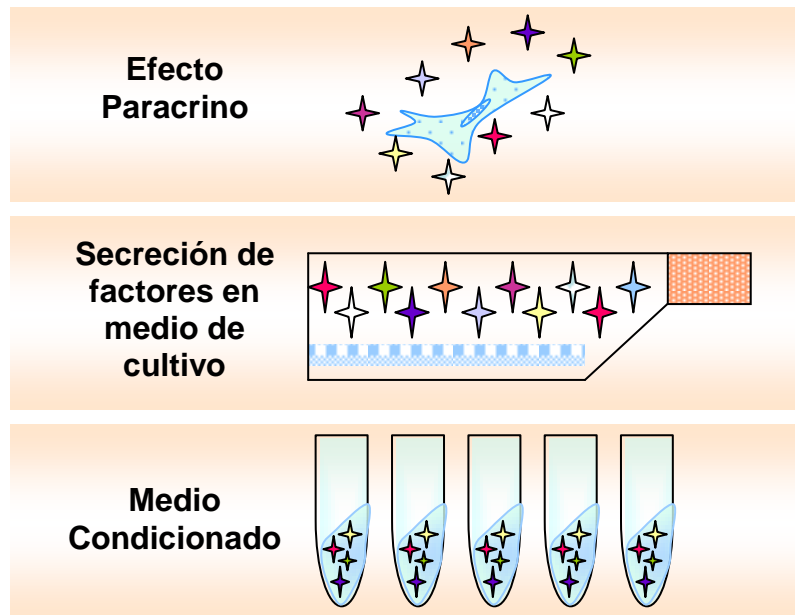


Figura 3. Esquema de obtención de un medio condicionado. Las MSC gracias a su efecto paracrino, secreta factores de crecimiento y moléculas de señalización al medio que utiliza para su crecimiento. De esta manera tras un cultivo in Vitro se puede obtener el medio condicionado enriquecido con las proteínas secretadas por las MSC.

4.5.3 Efecto inmunomodulador: Una de las características de las MSC, es la baja expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad HLA I y ausencia de las HLA II, lo que le confiere una baja inmunogenicidad y con esto su estabilidad a la hora de ser transplantadas incluso entre especies. Su efecto inmunomodulador se debe a la secreción de moléculas solubles como la indolamina-2-3-dioxigenasa (Mareschi, K. *et al.* 2006), que permite la acumulación de metabolitos de triptófano inhibiendo la respuesta inflamatoria (Ghannam, S. *et al.* 2010). De igual manera se postula como una fuente terapéutica para enfermedades inmunodegenerativas, ya que gracias a la interacción célula-célula y secreción de diversos factores, inhibe la actividad y proliferación de células T, células B y células Natural Killer (Chen, L. *et al.* 2008; Eliopoulos, N. *et al.* 2005; Maitra, B. *et al.* 2004; Uccelli, A. *et al.* 2006).

4.6 Células madre mesenquimales y regeneración medular

Para desarrollar una estrategia terapéutica que permita el reestablecimiento de las conexiones neuronales, es necesario conocer y modular la respuesta fisiopatológica de la lesión medular. Las MSC gracias a sus propiedades pueden considerarse como una alternativa terapéutica principalmente por tres razones:

1. Son células capaces de diferenciarse a linaje neuronal expresando marcadores específicos y mostrando actividad funcional en la transmisión de potenciales de acción (Coutts, M. and Keirstead, H. S. 2008; Kang, S. K. *et al.* 2007; Mareschi, K. *et al.* 2006; Mezey, E. *et al.* 2003; Wislet-Gendebien, S. *et al.* 2004; Yang, L. Y. *et al.* 2004).
2. Son células que secretan moléculas de señalización que modulan la respuesta inmunológica. Esta característica es muy importante ya que al producirse una lesión medular, se desencadena una respuesta inflamatoria que conlleva al desarrollo de diversas barreras de regeneración medular, como lo es la formación de la cicatriz glial. En las primeras 6 horas post-lesión, hay expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1 α , IL1 β , IL-6 y TNF α , que a su vez pueden activar la respuesta inmunomoduladora de las MSC y prevenir la activación de vías que favorezcan la formación de edema y muerte celular (Nakamura, M. *et al.* 2003).
3. Son células que secretan factores angiogénicos y neurotróficos que favorecen la neovascularización atenuando los procesos isquémicos, promueven la regeneración axonal y la migración de precursores neuronales favoreciendo el reestablecimiento de conexiones funcionales y activan vías de señalización como la PI3K que inician procesos de supervivencia celular (Chen, Z. L. *et al.* 2007; Massey, J. M. *et al.* 2008; Oudega, M. and Hagg, T. 1999; Willerth, S. M. and Sakiyama-Elbert, S. E. 2008).

4.7 Factores de crecimiento y regeneración medular

Debido a los mecanismos fisiopatológicos desencadenados tras una lesión medular, los factores de crecimiento, moléculas de señalización y citoquinas, cobran vital importancia por su capacidad de atravesar la cicatriz glial, promover la supervivencia neuronal y estimular el crecimiento axonal.

4.7.1 Factores neurotróficos: Son proteínas básicas de aproximadamente 13 KDa, que se dimerizan para formar especies biológicamente activas. El factor neurotrófico derivado del nervio (BDNF), factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y neurotrofinas (NT), hacen parte de esta familia, uniéndose a receptores de superficie como p75 y TrK y promoviendo el crecimiento neuronal (Chen, Z. L. *et al.* 2007). Específicamente el BDNF, secretado por las AdMSC, previene la muerte de motoneuronas luego de una lesión medular, aumenta el crecimiento axonal, promueve el crecimiento de fibras colinérgicas y participa en la sinaptogenesis y plasticidad neuronal (Blits, B. *et al.* 2003; Dougherty, K. D. *et al.* 2000; Levine, E. S. *et al.* 1995; Lu, P. *et al.* 2005).

4.7.2. Factores de crecimiento: Son sustancias de naturaleza proteica que controlan el ciclo celular. Entre ellos se destaca la acción del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), considerado como un factor mitogénico, morfogénico y anti-apoptótico, que se expresa en las neuronas de la raíz del ganglio dorsal (Hashimoto, N. *et al.* 2001), favorece la transmisión sensorial, incrementa la densidad capilar en la materia gris, disminuye el edema espinal (Shi, E. *et al.* 2006), inhibe la degeneración axonal, reduce la gliosis, promueve la supervivencia neuronal, estimula la proliferación de las células de Schwann y actúa como un quimioattractante de axones motores espinales (Anexo 2) (Ebens, A. *et al.* 1996; Kadoyama, K. *et al.* 2007; Pan, W. *et al.* 2006).

4.7.3. Citoquinas: Son proteínas que participan en procesos de comunicación proliferación y diferenciación celular. Una citoquina involucrada en la regeneración

/ reparación medular es la interleucina 6 (IL-6), que puede estar regulando las vías de señalización corriente arriba de cAMP, alterado principalmente por los cambios metabólicos de la neurona bajo la acción de los CSPG e inhibidores de mielina (Chen, Z. L. *et al.* 2007).

Finalmente con los reportes en la literatura que señalan que las MSC son capaces de diferenciarse a linaje neuronal ó secretar factores de crecimiento que promuevan la supervivencia celular bajo condiciones de estrés y permitan el reestablecimiento de conexiones neuronales, el presente trabajo pretende evaluar el efecto de hAdMSC y de MC en la recuperación motora de ratas con sección medular y correlacionarlo con el estudio histopatológico del sitio lesionado.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hAdMSC) y de los medios condicionados, en la recuperación funcional locomotora de ratas Wistar SPF con sección medular completa.

5.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano, en la recuperación locomotora de un modelo de lesión medular *in vivo*.

Evaluar el efecto de los medios condicionados provenientes de cultivos de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano, en la recuperación locomotora de un modelo de lesión medular *in vivo*.

Identificar si existe correlación entre la respuesta motora de ratas Wistar SPF sometidas a sección medular completa, con la valoración histopatológica del sitio

lesionado, tras el tratamiento con medios condicionados y/o células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano.

6. MARCO METODOLÓGICO

6.1 Tipo de estudio

Investigación de tipo experimental

6.2 Población

Se usaron 16 ratas machos Wistar SPF, entre 3 – 9 meses de edad. La investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Universidad Nacional, por lo que se aplicaron todas las normativas de las 3 R de Russell y Burch (Russell y Burch, 1959) y las recomendaciones del *ILAR (Internacional Laboratory Animal Research)* (ILAR, 1994) 64/432/CEE, 93/119/CE y modificada 526/CE-2007.

6.3 Sitio de la investigación

La obtención de las hAdMSC y de los medios condicionados, utilizados para el tratamiento de las ratas Wistar SPF, se realizó en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional. El procedimiento quirúrgico y la evaluación motora de las ratas, se realizaron en el Laboratorio de Neurociencias, de la Facultad de Medicina, de la Universidad de La Sabana.

6.4 Diseño muestral

Muestreo no probabilístico

6.5 Métodos

6.5.1 Cultivo celular y obtención de los medios condicionados: El cultivo y caracterización de las hAdMSC fue previamente estandarizado por el grupo de investigación “Biología de Células Madre” (Beltrán, O. 2007; Jain, A. et al. 2006; Mansilla, E. et al. 2005; Restrepo, S. 2009). A continuación se describen los procedimientos realizados en este proyecto.

- **Cultivo celular:** Stock congelados de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano previamente caracterizadas (Beltrán, O. 2007; Quintero, L. et al. 2007), fueron descongeladas, suspendidas en frascos T25 con 3mL de DMEM bajo en glucosa + SFB 10% (GIBCO™), penicilina 100U/mL, estreptomycin 100µg/mL e incubadas a 37°C con 5% CO₂. Se realizó cambio de medio de cultivo a las 24 horas para eliminar restos celulares y se continuó este procedimiento cada 2 ó 3 días para garantizar su crecimiento. Una vez alcanzaron el 80% de confluencia, se realizaron nuevos pasajes celulares hasta obtener células de 7° y 9° pasaje, las cuales se utilizaron posteriormente para el tratamiento de la lesión medular.
- **Obtención de medio condicionado:** Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano con un 80% de confluencia, fueron lavadas 3 veces con PBS pH 7.4 (GIBCO™) para eliminar restos de DMEM + SFB 10%. Posteriormente se adicionó 3ml de medio libre de suero bovino fetal (Opti-MEM® marca GIBCO™) con penicilina 100U/mL, estreptomycin 100µg/mL y se cultivo por 24h a 37°C, con una atmósfera de dióxido de carbono (CO₂) al 5%. Pasadas las 24h se recuperó el medio de cultivo y se centrifugó a 3000g por 10min en centrifuga refrigerada para eliminar restos celulares. Finalmente se adicionó un coctel de inhibidores de

proteasas, se realizaron las diluciones necesarias para que todos los medios condicionados quedaran a la misma concentración de proteína total (134µg/mL, cuantificada con el método de Bradford) y se almacenó a -20°C hasta el día de su implementación.

- ***Preparación de células para trasplante:*** Las células cultivadas en la Universidad Nacional fueron transportadas a la Universidad de La Sabana, donde se desprendieron del plato de cultivo con 200ul de tripsina al 2% por 5 min a 37°C, se recuperaron en 2ml de DMEM + SFB10% y se centrifugaron para hacer dos lavados con PBS pH7.4. Finalmente se realizó conteo celular tomando 20ul de la suspensión + 20ul de azul tripan y se contabilizaron las células viables en cámara de Neubauer. Se aspiró el volumen correspondiente a 100.000 células (según lo reportado por Shen, J. *et al.* 2009), se centrifugó y el pellet obtenido se resuspendió en 20ul de optimen ó de medio condicionado, según el tratamiento a aplicar.
- ***Preparación de la matriz de fibrina:*** Para elaborar la matriz de fibrina, se mezcló 20ul de Fibrinógeno (Sigma, Concentración final 20mg/ml) + 2 ul de trombina (Sigma, Concentración final 2.5UI) + 3ul de ácido tranexámico (Concentración final 30µg/ul). Esta matriz permanece en estado líquido aproximadamente 30 minutos después de su preparación, facilitando la mezcla con el tratamiento a aplicar y su manipulación en el procedimiento quirúrgico.

6.5.2 Procedimiento Quirúrgico y cuidado animal: Todos los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de Ketamina (IMALGENE[®], 100mg/Kg) y Xilacina (Rompún, BAYER[®], 10mg/Kg) diluidas en 1ml de solución

salina para facilitar su administración. Posteriormente se rasuro la zona a operar y sobre una cobija térmica se realizó laminectomia entre T8 - T10. Una vez expuesta la duramadre se seccionó la médula espinal con un microbisturí. Inmediatamente realizada la lesión, se administró hAdMSC, MC ó hAdMSC + MC y se procedió a cerrar la herida quirúrgica con vicryl 5-0 y prolene 6-0. Finalizada la cirugía se administró sulfatrimetropin (30mg/Kg) por vía IM cada 24h por 3 días, para prevenir o tratar la infección urinaria. En caso de no responder a dicho antibiótico, se administró Gentamicina 20mg/Kg cada 24h por 3 días acompañado de vitamina C vía oral. Para manejo del dolor se administró meloxicam 0.2mg/kg (meloxic 0.5%®) cada 24h por 5 días. Diariamente se vació vejiga haciendo presión sobre la misma dos veces al día hasta recuperar el control de esfínteres, se limpió el abdomen y se dejaron pañales desechables en las cajas, como material de cama para mantener los animales limpios y secos. El cambio de cajas se hizo dos veces a la semana y se suministró agua y comida diariamente ad libitum.

6.5.3 Tratamiento: A continuación se describe el tratamiento aplicado a las 16 ratas intervenidas:

- **Grupo 1:** Cirugía Falsa

1 Rata con laminectomia sin sección medular.

- **Grupo 2:** Control negativo

6 Ratas, a las que una vez realizada la lesión, se les administró 20ul de Optimen embebidos en la matriz de fibrina.

- **Grupo 3:** Tratamiento con células hAdMSC

4 Ratas, a las que una vez realizada la lesión, se les administró 20ul de Optimen con 100.000 hAdMSC embebidos en la matriz de fibrina

- **Grupo 4:** Tratamiento con medio condicionado

3 Ratas, a las que una vez realizada la lesión se les administró 20ul medio condicionado embebidos en la matriz de fibrina.

- **Grupo 5:** Tratamiento con hAdMSC más medio condicionado

2 Ratas, a las que una vez realizada la lesión se les administró 20ul medio condicionado con 100.000 hAdMSC embebidos en la matriz de fibrina.

Para el manejo de resultados se estipuló la siguiente nomenclatura:

Tipo de lesión	Tratamiento	ID Rata
C: Completa	Cél: Células hAdMSC MC: Medio condicionado CéIMC: Células hAdMSC + MC	Número

6.5.4 Análisis de recuperación motora: La recuperación motora fue evaluada mediante el uso de la escala Basso; Beattie y Bresnahan (Basso, D. M. *et al.* 1995; Basso, D. M. *et al.* 1996), dejando a la rata en un corredor acrílico de 150 x 20 x 20 cm, que permite observar y grabar al animal mientras se desplaza por este. Las ratas fueron entrenadas 15 días antes de la cirugía, dejando una cantidad considerable de hojuelas de cereal azucaradas en un extremo del acrílico, para estimular el avance de los animales. Se realizó la primera caminata de evaluación motora 3-4 días después de la cirugía para permitir la recuperación post-operatoria de las ratas y se continuó realizando una cada tercer día hasta completar 21 caminatas. Para cada caminata se realizó un análisis de huella, impregnando los miembros anteriores y posteriores con tinta no toxica y dejando caminar a la rata sobre el papel blanco (formas continuas) para evaluar apoyo plantar y coordinación. Posteriormente se evaluó a la rata en el corredor sin papel,

logrando evidenciar los movimientos ejecutados por los miembros posteriores (Ver anexo 1).

6.5.5 Eutanasia: Al finalizar la evaluación de recuperación motora (Posterior a 21 caminatas), los animales fueron sacrificados con sobredosis anestésica de pentobarbital sódico (Euthanex®, 150 mg/Kg) por vía intraperitoneal, siguiendo los lineamientos de AVMA 2007 (*American Veterinary Medical Association*) y las recomendaciones establecidas en la Ley 84 de 1989 y Resolución N° 008430 de Octubre 4 de 1993 del “Estatuto Nacional de Protección a los Animales” y “*Council for International Organizations of Medical Sciences*”, para asegurar que se induzca la muerte sin dolor.

6.5.6 Histología: Para la evaluación histológica se recuperó la región de la columna vertebral en la que se realizó la lesión y se fijó en formol tamponado al 37%. Después de la fijación, se retiró la médula espinal del canal medular con la ayuda de una microtijera. La médula se cortó longitudinalmente y se incluyó en parafina. Posteriormente se hicieron cortes longitudinales de 3µm para la evaluación histológica y se hizo la tinción de Hematoxilina Eosina.

6.5.7 Inmunohistoquímica: La evaluación inmunohistoquímica fue procesada en el servicio de patología de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional utilizando el método Avidin-Biotin-Peroxidasa para determinar la proteína S-100 presente en células neuronales y células de la glia.

7. RESULTADOS

Un total de 16 ratas con sección medular completa fueron incluidas en el presente estudio. La distribución de los grupos se describe en la tabla 1.

Tratamiento	No Ratas	Puntaje Promedio BBB
Control	6	0
Células	4	5,5 ± 1,1
Medio Condicionado	3	5 ± 0,8
Células + MC	2	4,5 ± 0,5
Cirugía falsa	1	21

Tabla 1. Descripción general de las ratas evaluadas. En esta tabla se describe el número de ratas por grupo de tratamiento y el puntaje máximo obtenido con la escala BBB para la evaluación motora.

7.1 Supervivencia

Un resultado relevante que se apreció en las ratas evaluadas, es la diferencia en la supervivencia de las que recibieron tratamiento con respecto al grupo control. De las 9 ratas tratadas con hAdMSC, MC y hAdMSC + MC, 7 superaron el tiempo de evaluación establecida, sacrificando 6 de ellas 49 - 97 días después de la cirugía (Tabla 2 y figura 4). Dos de las ratas con tratamiento fallecieron luego de 11 y 12 caminatas de evaluación, alcanzando un tiempo de supervivencia de 28 – 31 días respectivamente (Tabla 2 y figura 4). Por otra parte, las ratas control soportaron un tiempo máximo de supervivencia de 15 días. La posible causa de muerte estuvo aparentemente asociada a complicaciones de la función renal. Al realizar un análisis estadístico de supervivencia con la prueba de Kaplan Meier, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los

grupos con tratamiento (Figura 4). Por último, durante el tiempo de evaluación se observó que las ratas con sección medular completa y tratamiento, no mostraron úlceras de posición, ni sufrieron pérdida de peso significativa que causara descompensación en el animal (Figura 5).

Rata	Días post-Qx	No Caminatas	Desenlace
<i>Control (n=6)</i>	4-15	1-6	Fallecieron
<i>Células (n=1)</i>	57	22	
<i>MC (n=1)</i>	28	11	
<i>Cél +MC (n=1)</i>	31	12	
<i>Células (n=3)</i>	84 - 97	22 - 41	Sacrificadas
<i>MC (n=2)</i>	49 - 70	21 - 29	
<i>Cél + MC (n=1)</i>	69	27	
<i>Sham</i>	59	21	

Tabla 2. Supervivencia general de las ratas con lesión completa, donde se muestra el número de ratas por tratamiento que fallecieron durante el tiempo de evaluación y el número de ratas por tratamiento que fueron sacrificadas luego de completar el tiempo de estudio.

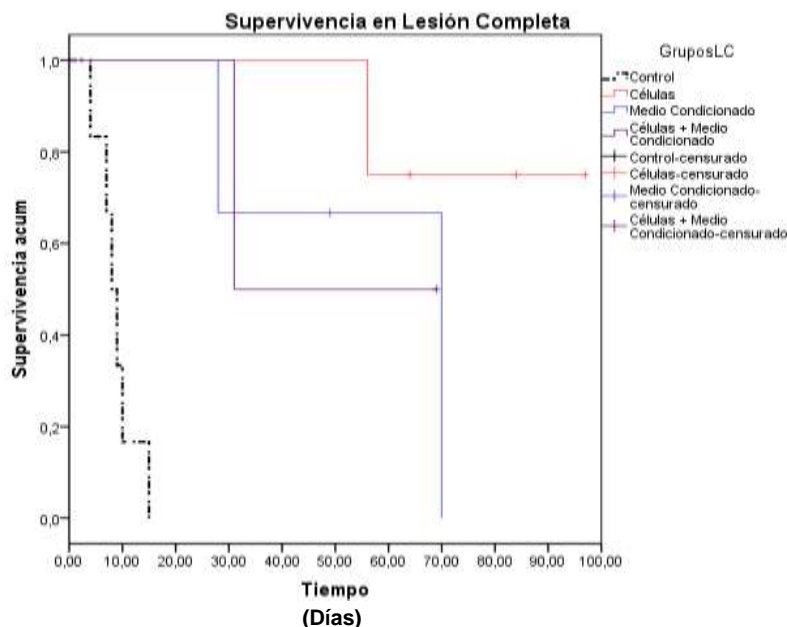


Figura 4. Análisis de supervivencia por Kaplan-Meier. La gráfica representa el tiempo de sobrevida de las ratas con sección medular completa. Las cruces representan los casos censurados, es decir, las ratas que fueron sacrificadas después de terminar el tiempo de estudio.

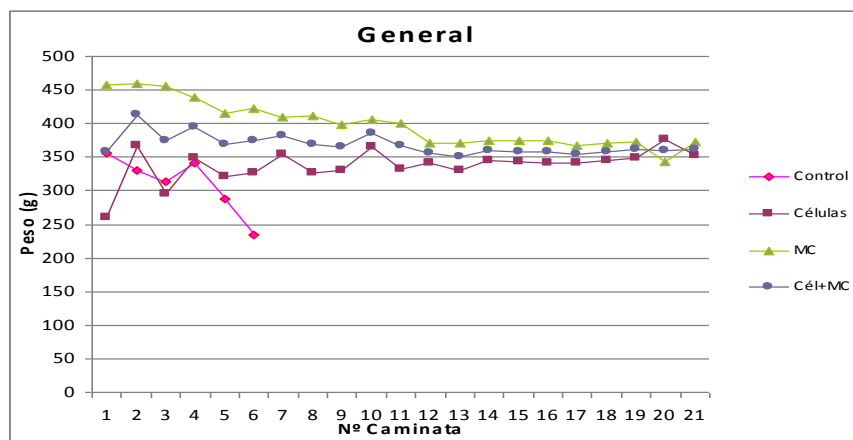
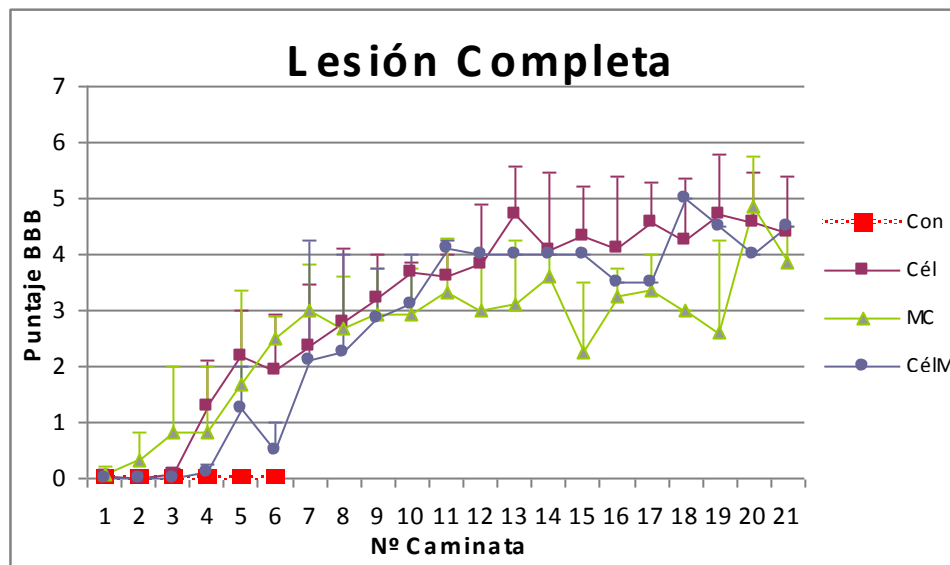


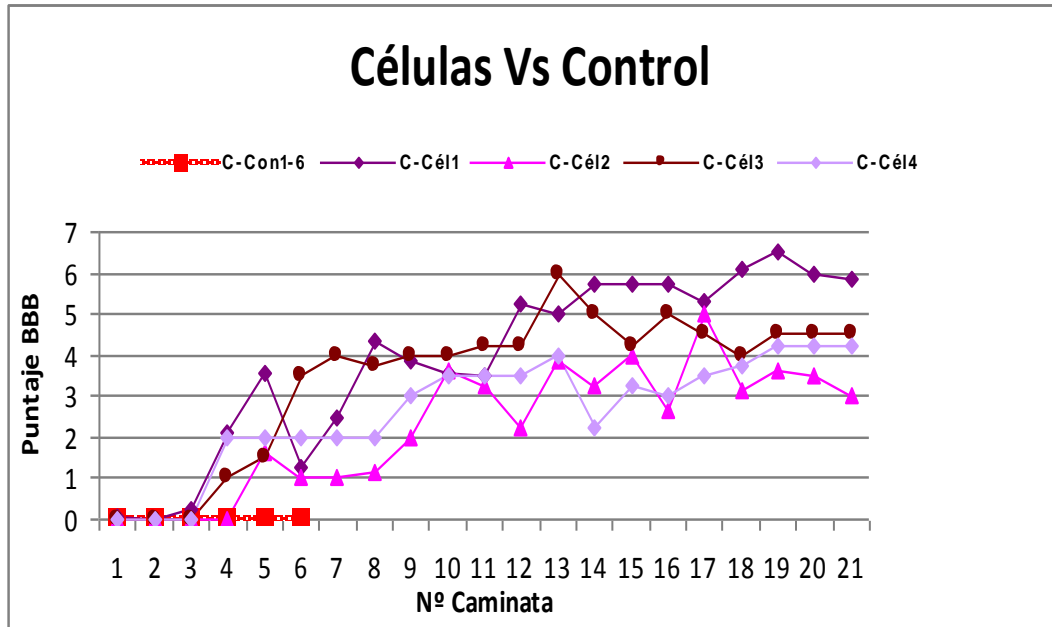
Figura 5. Variación del peso corporal durante el tiempo de evaluación. Las gráficas representan el cambio de peso corporal en las ratas evaluadas con sección medular completa.

7.2 Recuperación motora

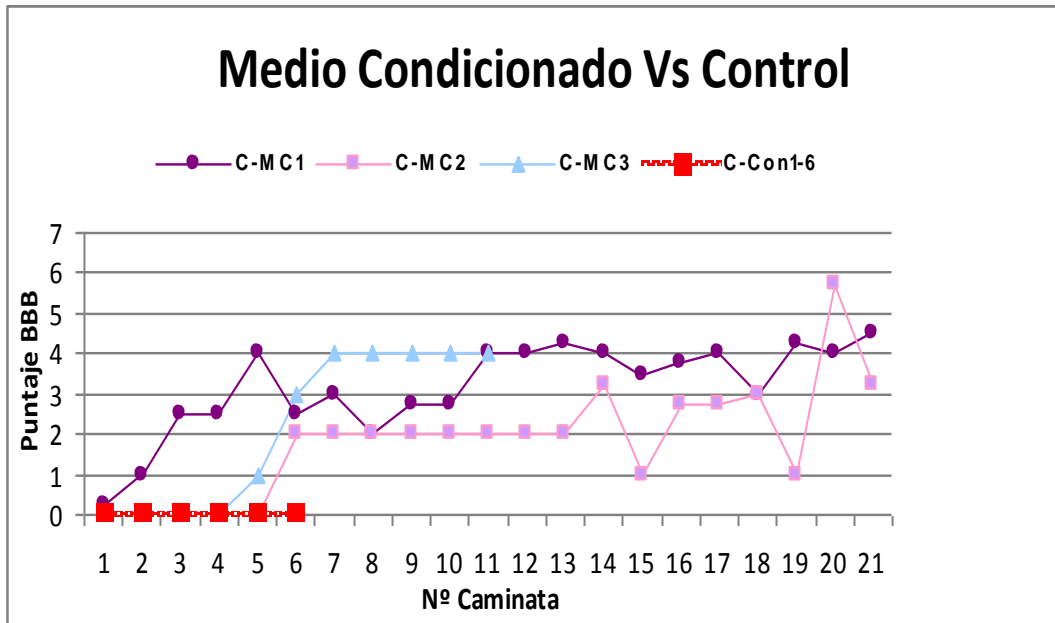
Las ratas control que presentaron un tiempo máximo de vida de 15 días (Figura 4), lograron ser evaluadas entre 1 – 6 caminatas, sin apreciar ningún movimiento en los miembros posteriores ni cola, durante este periodo (Tabla 1 y Figura 6). Por el contrario, en las ratas con tratamiento se apreciaron movimientos muy suaves desde la 3 y 6 caminata, adquiriendo un puntaje de 1 – 4 en la escala BBB (Figura 6). Al estimar el puntaje máximo durante todo el tiempo de evaluación, las ratas tratadas con células hAdMSC, alcanzaron un puntaje de 4 – 7 ($5,5\pm 1,1$), apreciándose movimientos suaves en los dos miembros posteriores ó movimientos extensos con capacidad de impulso en uno de ellos. Resultados muy similares, fueron observados en las ratas tratadas con medio condicionado y en las ratas con células + medio condicionado, ya que sus puntajes promedio fueron $5\pm 0,8$ y $4,5\pm 0,5$, respectivamente (Tabla 1 y Figura 6).



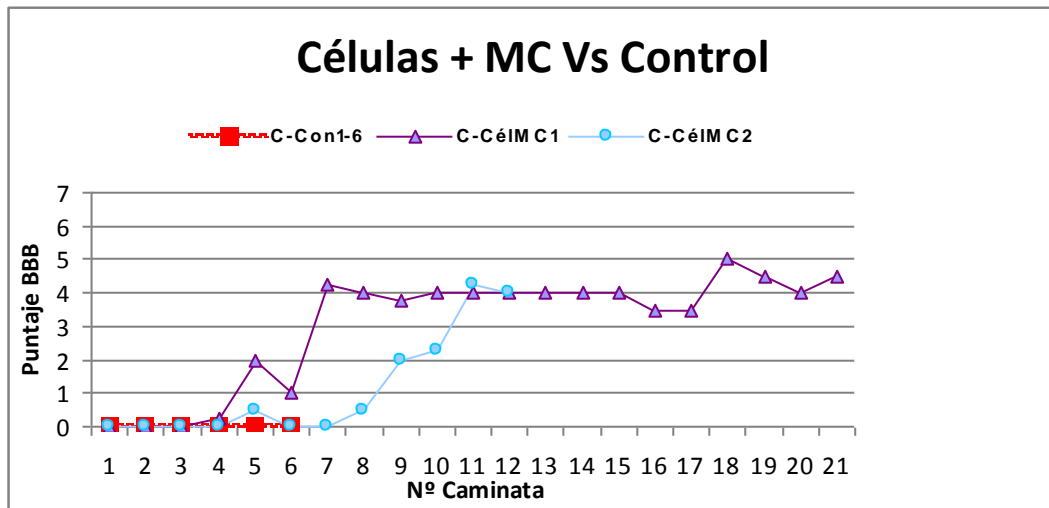
a.



b.



c.



d.

Figura 6. Recuperación motora de las ratas con lesión completa. a. Gráfica general comparando los puntajes promedio de cada grupo durante el tiempo de evaluación; b. Gráfica de comparación de los puntajes de ratas tratadas con células Vs Control de lesión completa; c. Gráfica de comparación de los puntajes de ratas tratadas con MC Vs Control de lesión completa; d. Gráfica de comparación de los puntajes de ratas tratadas con células + MC Vs Control de lesión completa.

7.3 Evaluación Histopatológica

Los resultados histopatológicos con la técnica de Hematoxilina Eosina (H.E.), mostraron que las ratas tratadas con hAdMSC, MC y hAdMSC + MC tienen una aparente reconexión comparado con el control de la cirugía, aunque se apreciaron algunas diferencias entre los grupos con tratamiento. En el grupo de ratas tratadas con hAdMSC, la médula espinal mostró aparente reconexión (Figura 7A) con cavidades pequeñas (Figura 7A y 7B) y presencia de múltiples células vacuoladas de núcleos periféricos pequeños (Figura 7C), sin embargo esta técnica no permite determinar la identidad de algunas de las células observadas.

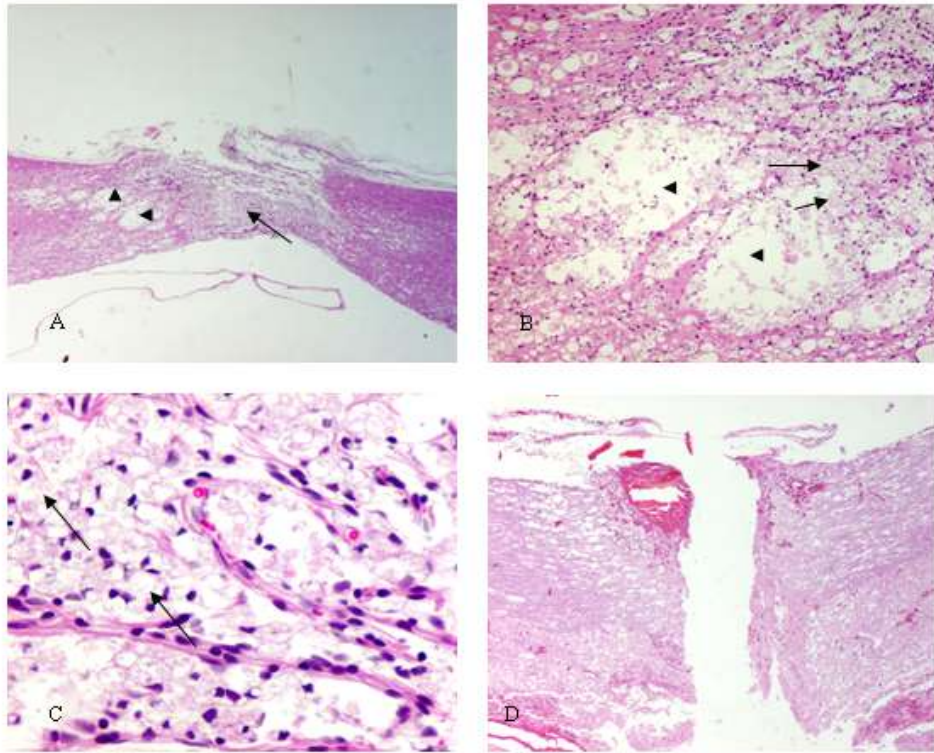


Figura 7. Evaluación histopatológica de la médula espinal de ratas tratadas con hAdMSC. A) Se observa una aparente reconexión (flechas) con pequeñas cavidades (cabezas de flecha). H.E. 40X. B) Con un mayor aumento se observan las cavidades pequeñas (flechas) con presencia de células vacuoladas (cabezas de flecha). H.E. 200X. C) Detalle de la foto anterior donde se evidencian claramente células vacuoladas con núcleos periféricos (flechas). H.E. 400X. D) Fotografía de una médula espinal como control de la lesión, sin observar unión de los fragmentos extremos medulares H.E. 200X.

Por otro lado, en el grupo de ratas tratadas con medio condicionado se observaron también áreas de aparente reconexión. Aquí se vieron cavidades de mayor tamaño en comparación con las observadas en el grupo de células (Figura 8A y 8B). En el área de aparente reconexión se observaron células alargadas de núcleos pequeños también alargados (Figura 8C). La coloración de hematoxilina eosina no permitió identificar el tipo celular.

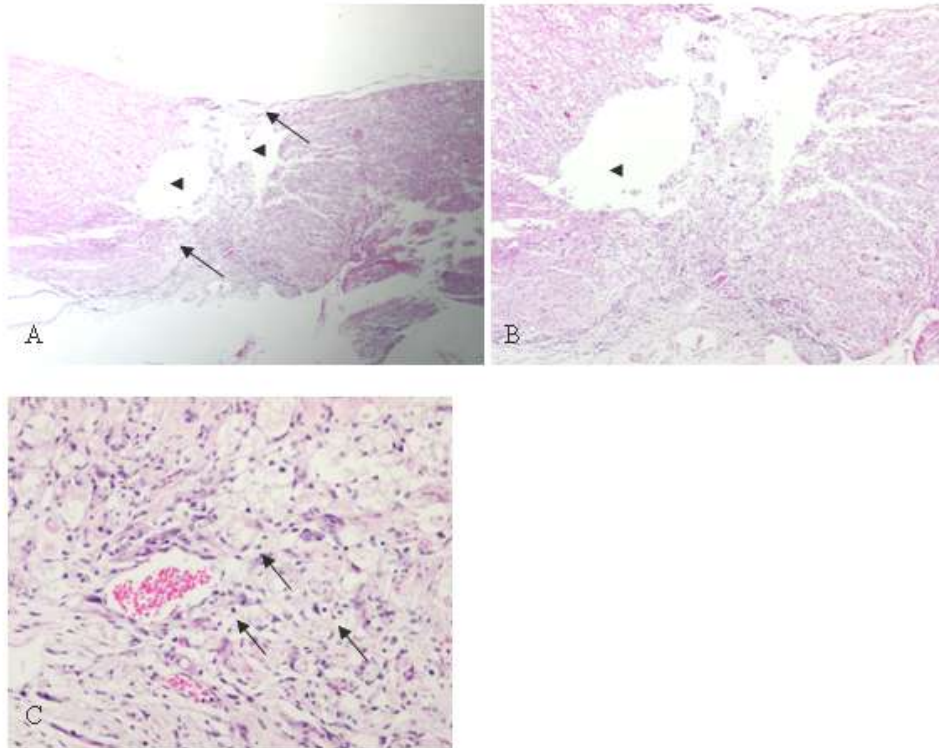


Figura 8. Evaluación histopatológica de la médula espinal de ratas tratadas con medio condicionado. A) Se observa focos de aparente reconexión (flechas) con cavidades de mayor tamaño (cabezas de flecha). H.E. 40X B) Detalle de las cavidades mayores (cabezas de flecha). H.E. C) Se evidencian células alargadas de núcleos alargados (flechas). H.E. 400X.

Finalmente, en el grupo de ratas tratadas con hAdMSC y medio condicionado se logró observar una conexión más evidente. Se aprecia abundante celularidad en el sitio de reconexión y no se evidenciaron cavidades de ningún tamaño (Figura 9A y 9B). Las células en el sitio de reconexión son aparentemente dos poblaciones. Células grandes vacuoladas de núcleos pequeños periféricos (como las vistas en el grupo de animales con tratamiento de células únicamente) y células alargadas de núcleos alargados (Figura 9C). Al igual que en los dos grupos anteriores esta técnica no pudo diferenciar la identidad de las células.

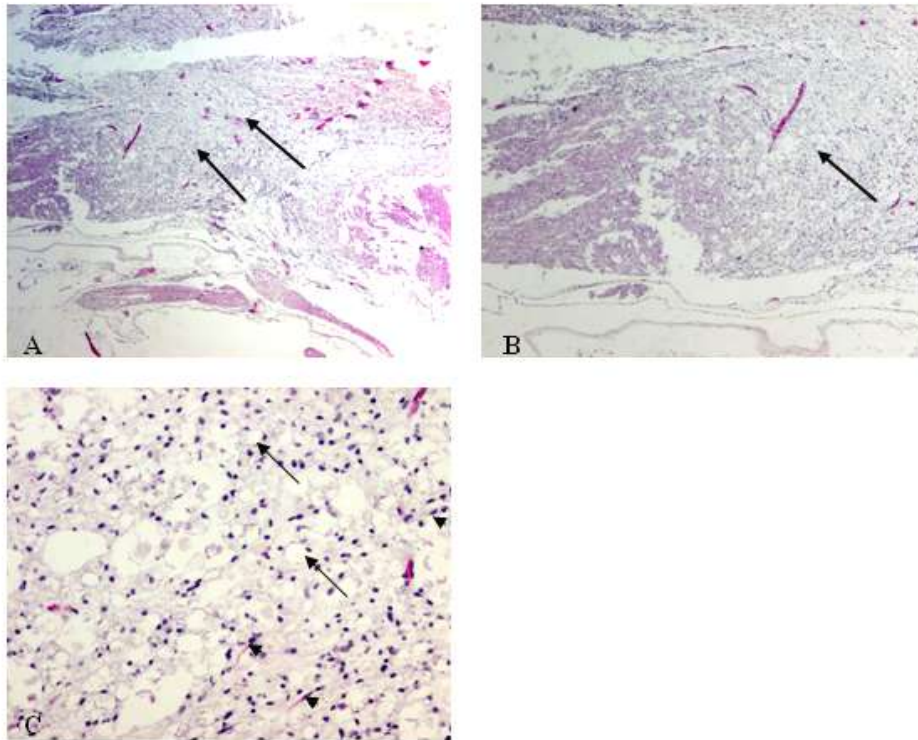


Figura 9. Evaluación histopatológica de la médula espinal de ratas tratadas con hAdMSC y medio condicionado. A) Se observa aparente reconexión medular con alta celularidad en el área (flechas). H.E. 40X B) Detalle de la anterior, donde se aprecia la alta celularidad (flecha). H.E. 200X. C) Se evidencian las células vacuoladas de núcleos periféricos (flechas) con células alargadas de núcleos alargados (cabezas de flecha). H.E. 400X aprox.

7.4. Evaluación inmunohistoquímica: Se realizó tinción inmunohistoquímica con marcador S-100 para determinar si las células observadas en la evaluación histopatológica son de origen neuronal. Los resultados muestran fibras S-100 positivas en el área de la lesión uniendo los extremos de la médula espinal (Figura 10).

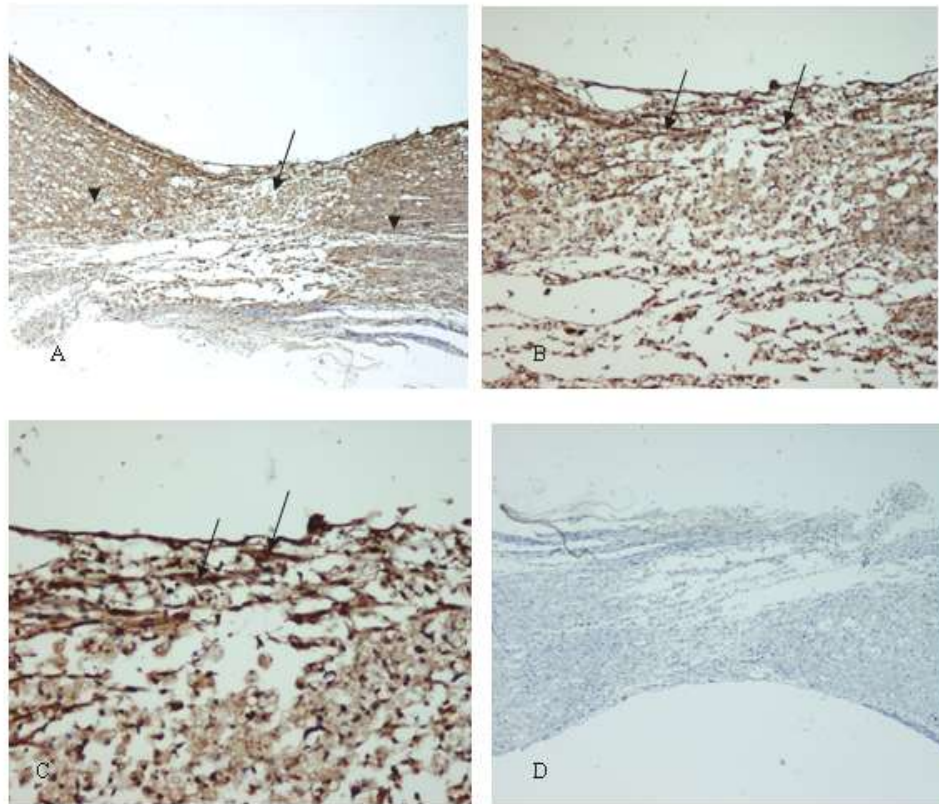


Figura 10. Inmunomarcador S-100 en cortes histológicos de la lesión medular. A) Se aprecian los extremos de la médula espinal (cabezas de flecha) y el área de la lesión con aparente reconexión y marcación positiva para S-100 (flechas) 40X. B) Con el aumento 200X se observa tinción positiva en el área de la lesión, que se muestra a manera de fibras (flechas). 200X. C) Detalle de la foto anterior donde se evidencian claramente las fibras S-100 positivas (flechas) 400X. D). Control negativo de S-100.

8. DISCUSIÓN

Recientemente, múltiples publicaciones se han enfocado en que la capacidad reparadora de las células madre mesenquimales, se debe a su efecto paracrino con la secreción de factores de crecimiento y moléculas de señalización en el sitio

de la lesión y no a su implantación y diferenciación en el tejido lesionado (Chen, L. *et al.* 2008; van Poll, D. *et al.* 2008). En el presente estudio, al evaluar el efecto de los medios condicionados (MC) y de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hAdMSC) en la recuperación motora de ratas con lesión medular, se aprecia que las ratas que recibieron hAdMSC (4/15), MC (3/15) y hAdMSC + MC (2/15) respondieron de manera muy similar, sobreviviendo entre 28 y 97 días, con puntajes de 4 – 7 acordes a un nivel de recuperación motora inicial (Basso, D. M. *et al.* 1995; Basso, D. M. *et al.* 1996), mientras que el grupo control (6/15) sobrevivió entre 4 -15 días después de la cirugía, sin revelar ningún grado de recuperación motora. Al comparar los puntajes de cada grupo en la 4 - 6 caminata, se apreció el retorno de movimientos aislados en uno o los dos miembros posteriores de las ratas tratadas con hAdMSC, MC y hAdMSC + MC, logrando puntajes de 1-4 los cuales aumentaron tras completar las 21 caminatas, mientras que el grupo control conservó un puntaje de 0 durante todo el tiempo de evaluación. La ausencia de movimientos una semana después de la cirugía como ocurrió en el grupo control, da lugar a pensar que el nivel de recuperación es nulo o que sería muy bajo en caso de presentarse el retorno de alguna función medular con el paso del tiempo, ya que otros trabajos señalan que los modelos animales al igual que los grupos con tratamiento del presente estudio, manifiestan diversos grados de recuperación motora a partir de la segunda semana de evaluación (Cummings, B. J. *et al.* 2005; Gómez, R. 2008; Kim, S. and Kwak, H. 2007; Ko, J. *et al.* 2006; Mansilla, E. *et al.* 2005; Oh, J. S. *et al.* 2010; Osaka, M. *et al.* 2010; Yan, Q. *et al.* 2009). Adicionalmente, el trabajo realizado por Kang, S. K. *et al.* (2007), con extractos celulares de las AdMSC, reporta el retorno de movimientos funcionales en ratas con lesión medular torácica. Por esta razón, el nivel de recuperación motora inicial observado a partir de la segunda semana post-quirúrgica en las ratas con tratamiento, que alcanza puntajes similares e incluso superiores a los obtenidos en otros estudios (Kabatás, S. *et al.* 2008; López-Vales, R. *et al.* 2006; Lu, J. *et al.* 2001; Ramon-Cueto, A. *et al.* 2000; Yan, Q. *et al.* 2009), sugiere que tanto las hAdMSC como los medios condicionados, favorecen la

recuperación motora inicial, facilitando el desplazamiento de las ratas y disminuyendo el desarrollo de úlceras de posición.

Por otra parte, la diferencia en el tiempo de supervivencia entre las ratas con tratamiento y el grupo control, puede atribuirse a la acción de las células o de los MC en la recuperación de lesiones medulares, ya que dependiendo del nivel y severidad de la lesión, se generan complicaciones posquirúrgicas como la disminución del tránsito intestinal que puede resultar en peritonitis (Gondim, F. A. *et al.* 1998; Kabatas, S. *et al.* 2008; Medeiros, B. A. *et al.* 2008) y una alteración de la función renal que favorece el desarrollo de la vejiga neurogénica y con ello retención urinaria, infecciones a repetición e incluso ruptura vesical (Hong, C. and Henderson, F. 1989; Iijima, K. *et al.* 2009; Leung, P. Y. *et al.* 2007). A su vez la distensión urinaria y abdominal, promueven el aumento de los reflejos parasimpáticos que conlleva a contracciones involuntarias de los miembros posteriores e hipertensión arterial (Gondim, F. A. *et al.* 1998; Guest, J. D. *et al.* 2008). Adicionalmente, algunos autores reportan otras complicaciones postquirúrgicas como automutilación por sensaciones dolorosas, pérdida de peso y cambio del puntaje en la escala BBB, a consecuencia de la disfunción vesical (Guest, J. D. *et al.* 2008). Hong, C. y Henderson, F. (1989), resaltan que la principal causa de muerte en ratas con lesión medular es la infección urinaria, demostrando que aunque se aplicara Penicilina/Estreptomicina -200U/250mg- ó Gentamicina -20mg/kg- en ratas con contusión en T5-T7, el 52% (13/25) y 30.6% (15/49) murieron, siendo el 32% (8/25) y 16.3% (8/49) secundario a infecciones urinarias. Estas complicaciones podrían disminuir con la reconexión de fibras nerviosas implicadas en la transmisión de información motora y sensorial a través de la médula espinal (Cervero, F. and Connell, L. A. 1984; de Groat, W. C. *et al.* 1990; Morgan, C. *et al.* 1981; Willis, William D. and Coggeshall, Richard E. 1991). Tras el tratamiento con MSC en modelos experimentales con lesión medular, se aprecia el crecimiento de fibras nerviosas pertenecientes al tracto raquídeo y corticoespinal implicados en funciones sensoriales y locomotoras (Liu, Z. *et al.*

2007; Lu, P. *et al.* 2005; Yan, Q. *et al.* 2009). Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con hAdMSC y/o MC, favorecen el recrecimiento de fibras sensoriales en la médula espinal lesionada y con ello el reestablecimiento de funciones viscerales que prolongan el tiempo de vida en las ratas con sección medular completa, ya que a pesar de no establecer la causa real de muerte y no realizar estudios adicionales que nos permitieran valorar la función renal y gastrointestinal de las ratas evaluadas en este estudio, llama la atención que siguiendo los mismos cuidados post-quirúrgicos con la aplicación de dos antibióticos diferentes para el manejo de infecciones urinarias, las ratas con tratamiento sobreviven más tiempo, presentándose diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control.

Recientes investigaciones, señalan que las MSC en una lesión de la médula espinal, pueden diferenciarse a linaje neuronal (Brohlin, M. *et al.* 2009; Coutts, M. and Keirstead, H. S. 2008; Kang, S. K. *et al.* 2007; Mareschi, K. *et al.* 2006; Mezey, E. *et al.* 2003; Wislet-Gendebien, S. *et al.* 2004; Yang, L. Y. *et al.* 2004), secretar moléculas de señalización que reduzcan la formación de la cicatriz glial considerada como la principal barrera de regeneración medular (Abdi, R. *et al.* 2008; Ghannam, S. *et al.* 2010; Osaka, M. *et al.* 2010; Tyndall, A. and Uccelli, A. 2009; Uccelli, A. *et al.* 2008; Uccelli, A. *et al.* 2006; Uccelli, A. *et al.* 2007) y liberar factores angiogénicos y neurotróficos que atenúen procesos isquémicos, aumenten la supervivencia neuronal por activación de las vías PI3K y MAPK y favorezcan el reestablecimiento de conexiones neuronales (Chen, Z. L. *et al.* 2007; Massey, J. M. *et al.* 2008; Oudega, M. and Hagg, T. 1999; Willerth, S. M. and Sakiyama-Elbert, S. E. 2008). Bajo este contexto, al evidenciar que tanto las células como los medios condicionados producen el mismo nivel de recuperación en ratas con sección medular completa, se sugiere que es el efecto paracrino de las hAdMSC, lo que permite el retorno de movimientos aislados en los miembros posteriores de las ratas evaluadas, descartando el papel de la matriz de fibrina que reemplaza la matriz extracelular alterada y brinda un soporte para el

crecimiento de axones lesionados (Jain, A. *et al.* 2006; Lee, O. K. 2008; Mansilla, E. *et al.* 2005), ya que ninguna de las ratas control presentó el retorno de movimientos. Por otro lado, llama la atención que al aplicar simultáneamente estas dos fuentes de factores de crecimiento en ratas con sección medular completa, no se observa una ventaja en la recuperación funcional, lo cual da lugar a pensar, que los receptores a los que se unen estas moléculas de señalización (Trk, c-met; VEGFR, entre otros) se saturan con concentraciones específicas de cada factor (Wang, X. H. and Poo, M.M. 1997; Wehrman, T. 2007). Estudios realizados con la aplicación de concentraciones crecientes de factores de crecimiento en modelos animales con lesión medular, muestran que la recuperación motora progresa hasta determinada concentración, presentando un efecto de meseta con mayores cantidades de la proteína (Iannotti, C. *et al.* 2004; Jakeman, L. B. *et al.* 1998; Soril, L. J. *et al.* 2008). Con estos resultados, sería interesante evaluar si la aplicación de una mayor concentración de medio condicionado o un mayor número de células en el sitio de la lesión, presentaría una ventaja en la recuperación funcional ó si por el contrario tras inyecciones seriadas de estos factores con intervalos de tiempo establecidos, que eviten la saturación de receptores, los animales tendrían el retorno de movimientos más funcionales.

Además de apreciar la recuperación motora inicial y el aumento de la supervivencia en ratas con sección medular completa, vale la pena mencionar que a pesar de aplicar AdMSC de origen humano a ratas sin régimen de inmunosupresión, no se presentaron problemas típicos de rechazo inmunológico. Esto podría explicarse por la ausencia de antígenos HLA clase II en las MSC y por su capacidad inmunomoduladora gracias a la secreción de moléculas de señalización que reprimen la acción de células que participan en la respuesta inmunológica (Abdi, R. *et al.* 2008; Ghannam, S. *et al.* 2010; Tyndall, A. and Uccelli, A. 2009; Uccelli, A. *et al.* 2008; Uccelli, A. *et al.* 2006; Uccelli, A. *et al.* 2007). En futuras aplicaciones terapéuticas, esto reduciría el uso de agentes inmunosupresores ó la restricción a transplantes autólogos, además de

considerarse como una opción para el tratamiento de enfermedades que comprometan un desorden en el sistema inmunológico.

Actualmente, en la revisión de literatura científica realizada por el grupo de investigación, no se ha encontrado ninguna publicación que evalúe el efecto de los medios condicionados derivados de las hAdMSC en las ratas con sección medular, por lo que nuestro trabajo es pionero en demostrar que tanto las células como los medios condicionados enriquecidos con sus factores de crecimiento, tienen un efecto similar en la recuperación de ratas con sección medular completa, aumentando la supervivencia y favoreciendo el retorno de movimientos en los miembros posteriores característicos de la recuperación motora inicial. A futuro, pensando en la aplicación de los medios condicionados en lugar de las células, para la recuperación de pacientes con lesiones medulares, los MC se convertirían en un tratamiento práctico, de fácil obtención, almacenamiento, transporte y manipulación, ya que de un solo donante se podrían beneficiar múltiples personas, mejorando su calidad de vida y reduciendo el riesgo de migración de las células madre a sitios no deseados que promuevan el desarrollo de masas tumorales (Rattigan, Y. *et al.* 2010; Roorda, B. D. *et al.* 2009).

Otra forma de determinar la recuperación de lesiones medulares es estimando el reestablecimiento de la función sensorial (Lee, J. W. *et al.* 2008; Sedy, J. *et al.* 2008). En este estudio aunque no se evaluó de manera sistemática la respuesta de las ratas ante el roce o presión de los miembros posteriores con una pinza quirúrgica, los grupos con tratamiento respondieron a este estímulo a partir de la segunda – tercera semana pos-operatoria, intentando retirar el miembro posterior evaluado o moviendo el miembro posterior opuesto. Adicionalmente, algunas de las ratas con tratamiento lograron acicalarse uno o los dos miembros posteriores, tiempo después de la cirugía. La confirmación de estos resultados en futuras investigaciones, acompañando de la terapia física que reduzca la pérdida de masa muscular y estimule el reconocimiento y uso de los dos miembros posteriores,

permitirían pensar en alternativas terapéuticas que favorezcan el retorno de movimientos más funcionales (Ying, Z. *et al.* 2005).

Finalmente, los resultados obtenidos con la evaluación histopatológica del sitio lesionado, que muestran una aparente reconexión entre los dos extremos de la médula espinal, con diferencias en el grado de reconexión en los tres grupos tratamiento, podrían correlacionarse con la recuperación motora inicial de las ratas estudiadas. La morfología del sitio lesionado evaluada con la tinción H.E., sugiere que las células vacuoladas son exclusivas de las ratas que recibieron hAdMSC, al no observarse en las ratas que recibieron medio condicionado, mientras que las células alargadas con núcleos alargados, al parecer son exclusivas de las ratas que recibieron medio condicionado ya que en las ratas con hAdMSC no se observaron. Debido a que la tinción con H.E. no permite determinar la identidad de las células presentes en el sitio de la lesión, el desarrollo de estudios adicionales con tinciones inmunohistoquímicas, permitirá establecer si las células vacuoladas son estados de diferenciación de las hAdMSC y si las células alargadas son propias del animal para favorecer la reconexión neuronal gracias a la acción de los factores neurotróficos. Basados en esto, se realizó la evaluación inmunohistoquímica para el marcador S-100 que reconoce una subpoblación de neuronas, células de la glía y las células de Schwann que recubren y mielinizan los axones (Chi, G. F. *et al.* 2010; Firouzi, M. *et al.* 2006; Ichikawa, H. *et al.* 1997; Rickmann, M. and Wolff, J. R. 1995), el cual mostró fibras S-100 positivas que reconectan los dos extremos de la médula espinal, sugiriendo una reconexión neuronal por el crecimiento de axones mielinizados o por la migración de células de la glía al sitio de la lesión, sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales que permitan determinar el fenotipo de las células allí presentes y así entender el mecanismo utilizado por estas fuentes terapéuticas para favorecer la recuperación de lesiones medulares.

9. CONCLUSIONES

El tratamiento con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano y con medios condicionados, favorece la recuperación motora de ratas con sección medular completa.

Se observó que los medios condicionados producen un efecto similar a las hAdMSC, en la recuperación motora de ratas con sección medular completa, sugiriendo que este resultado se debe al efecto paracrino de las AdMSC.

La aplicación simultánea de dos fuentes de factores de crecimiento, no permite un nivel superior de recuperación funcional en ratas con sección medular completa.

El tratamiento con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano y con medios condicionados, favorece la supervivencia de ratas con sección medular completa, presentando diferencias estadísticamente significativas con el grupo control.

El efecto terapéutico de las hAdMSC, podría deberse a la capacidad inmunomoduladora, la acción neurotrófica y el efecto angiogénico de los factores secretados por las AdMSC.

Los resultados obtenidos con el trasplante de AdMSC de origen humano en ratas sin régimen de inmunosupresión, confirman lo reportado por otros autores que señalan que las MSC no generan rechazo inmunológico.

Los medios condicionados presentan la ventaja que permitirían reducir costos en su obtención y su aplicación terapéutica.

Los medios condicionados podrían convertirse en una estrategia terapéutica práctica, de fácil obtención, transporte y manipulación.

La matriz de fibrina utilizada para el presente estudio, al inyectarse líquida y polimerizarse en el sitio de la lesión, presentaría ventajas en su aplicación clínica, reemplazando la matriz extracelular y brindando un soporte para el crecimiento de axones neuronales.

10. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Evaluar y cuantificar los factores de crecimiento presentes en los medios condicionados y determinar su acción en las lesiones medulares.

Evaluar si con mayores concentraciones de medio condicionado, se saturarían los receptores identificados de los factores de crecimiento y presentarían un efecto de meseta en la recuperación funcional.

Realizar ensayos en los que además de aplicar medios condicionados, se trate al animal con terapia física para disminuir la espasticidad y la pérdida de masa muscular y de esta manera evaluar si hay retorno de movimiento en los dos miembros posteriores.

Determinar el efecto de los medios condicionados y de las hAdMSC con un mayor número de modelos experimentales, para ver la reproducibilidad de los resultados en la recuperación funcional de lesiones medulares.

Identificar la población celular presente en el sitio lesionado de la médula espinal, tras la aplicación de hAdMSC y medio condicionado.

Realizar coloraciones anterogadas y retrogradas que permitan evaluar la reconexión neuronal.

Marcar las células hAdMSC y tras el trasplante en diferentes modelos experimentales, evaluar su distribución y diferenciación en el sitio de la lesión.

11. BIBLIOGRAFIA

- Abdi, R.; Fiorina, P.; Adra, C. N. *et al.* (2008). "Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes." Diabetes **57**(7): 1759-67.
- Barros Filho, T. E. and Molina, A. E. (2008). "Analysis of the sensitivity and reproducibility of the Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale in Wistar rats." Clinics (Sao Paulo) **63**(1): 103-8.
- Basso, D. M.; Beattie, M. S. and Bresnahan, J. C. (1995). "A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats." J Neurotrauma **12**(1): 1-21.
- Basso, D. M.; Beattie, M. S.; Bresnahan, J. C. *et al.* (1996). "MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study." J Neurotrauma **13**(7): 343-59.
- Bauchet, L.; Lonjon, N.; Perrin, F. E. *et al.* (2008). "Strategies for spinal cord repair after injury: A review of the literature and information." Ann Readapt Med Phys.
- Beltrán, O. (2007). Expresión de Factores angiogénicos en células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo, en condiciones de normoxia e hipoxia. Genética humana. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia.

- Blits, B.; Oudega, M.; Boer, G. J. *et al.* (2003). "Adeno-associated viral vector-mediated neurotrophin gene transfer in the injured adult rat spinal cord improves hind-limb function." Neuroscience **118**(1): 271-81.
- Brohlin, M.; Mahay, D.; Novikov, L. N. *et al.* (2009). "Characterisation of human mesenchymal stem cells following differentiation into Schwann cell-like cells." Neurosci Res **64**(1): 41-9.
- Busch, S. A. and Silver, J. (2007). "The role of extracellular matrix in CNS regeneration." Curr Opin Neurobiol **17**(1): 120-7.
- Cervero, F. and Connell, L. A. (1984). "Distribution of somatic and visceral primary afferent fibres within the thoracic spinal cord of the cat." J Comp Neurol **230**(1): 88-98.
- Coutts, M. and Keirstead, H. S. (2008). "Stem cells for the treatment of spinal cord injury." Exp Neurol **209**(2): 368-77.
- Cummings, B. J.; Uchida, N.; Tamaki, S. J. *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): 14069-74.
- Chen, L.; Tredget, E. E.; Wu, P. Y. *et al.* (2008). "Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing." PLoS One **3**(4): e1886.
- Chen, S. L.; Fang, W. W.; Ye, F. *et al.* (2004). "Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction." Am J Cardiol **94**(1): 92-5.

- Chen, Z. L.; Yu, W. M. and Strickland, S. (2007). "Peripheral regeneration." Annu Rev Neurosci **30**: 209-33.
- Chi, G. F.; Kim, M. R.; Kim, D. W. *et al.* (2010). "Schwann cells differentiated from spheroid-forming cells of rat subcutaneous fat tissue myelinate axons in the spinal cord injury." Exp Neurol **222**(2): 304-17.
- de Groat, W. C.; Kawatani, M.; Hisamitsu, T. *et al.* (1990). "Mechanisms underlying the recovery of urinary bladder function following spinal cord injury." J Auton Nerv Syst **30 Suppl**: S71-7.
- de Kretser, D. (2007). "Totipotent, pluripotent or unipotent stem cells: a complex regulatory enigma and fascinating biology." J Law Med **15**(2): 212-8.
- Deumens, R.; Koopmans, G. C. and Joosten, E. A. (2005). "Regeneration of descending axon tracts after spinal cord injury." Prog Neurobiol **77**(1-2): 57-89.
- Dietz, V. and Curt, A. (2006). "Neurological aspects of spinal-cord repair: promises and challenges." Lancet Neurol **5**(8): 688-94.
- Dougherty, K. D.; Dreyfus, C. F. and Black, I. B. (2000). "Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury." Neurobiol Dis **7**(6 Pt B): 574-85.
- Ebens, A.; Brose, K.; Leonardo, E. D. *et al.* (1996). "Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons." Neuron **17**(6): 1157-72.

- Eliopoulos, N.; Stagg, J.; Lejeune, L. *et al.* (2005). "Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice." Blood **106**(13): 4057-65.
- Fawcett, J. W. and Asher, R. A. (1999). "The glial scar and central nervous system repair." Brain Res Bull **49**(6): 377-91.
- Firouzi, M.; Moshayedi, P.; Saberi, H. *et al.* (2006). "Transplantation of Schwann cells to subarachnoid space induces repair in contused rat spinal cord." Neurosci Lett **402**(1-2): 66-70.
- Fitch, M. T. and Silver, J. (2008). "CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure." Exp Neurol **209**(2): 294-301.
- Ghannam, S.; Bouffi, C.; Djouad, F. *et al.* (2010). "Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications." Stem Cell Res Ther **1**(1): 2.
- Gomez-Pinilla, F.; Huie, J. R.; Ying, Z. *et al.* (2007). "BDNF and learning: Evidence that instrumental training promotes learning within the spinal cord by up-regulating BDNF expression." Neuroscience **148**(4): 893-906.
- Gómez, R. (2008). Utilización de Células de Glía Envoltante y de Proteínas Sintéticas en la Recuperación Funcional en un Modelo de Sección Medular In Vivo. Neurobiología. Bogotá, Pontificia Universidad Javeriana.
- Gondim, F. A.; da-Graca, J. R.; de-Oliveira, G. R. *et al.* (1998). "Decreased gastric emptying and gastrointestinal and intestinal transits of liquid after complete spinal cord transection in awake rats." Braz J Med Biol Res **31**(12): 1605-10.

- Gorska, T.; Chojnicka-Gittins, B.; Majczynski, H. *et al.* (2009). "Recovery of overground locomotion following partial spinal lesions of different extent in the rat." Behav Brain Res **196**(2): 286-96.
- Guest, J. D.; Herrera, L.; Margitich, I. *et al.* (2008). "Xenografts of expanded primate olfactory ensheathing glia support transient behavioral recovery that is independent of serotonergic or corticospinal axonal regeneration in nude rats following spinal cord transection." Exp Neurol **212**(2): 261-74.
- Hashimoto, N.; Yamanaka, H.; Fukuoka, T. *et al.* (2001). "Expression of hepatocyte growth factor in primary sensory neurons of adult rats." Brain Res Mol Brain Res **97**(1): 83-8.
- Hong, C. and Henderson, F. (1989). "Urinary tract infections associated with spinal cord injury in rats." J Med Sci **9**(5): 317-325.
- Iannotti, C.; Ping Zhang, Y.; Shields, C. B. *et al.* (2004). "A neuroprotective role of glial cell line-derived neurotrophic factor following moderate spinal cord contusion injury." Exp Neurol **189**(2): 317-32.
- Ichikawa, H.; Jacobowitz, D. M. and Sugimoto, T. (1997). "S100 protein-immunoreactive primary sensory neurons in the trigeminal and dorsal root ganglia of the rat." Brain Res **748**(1-2): 253-7.
- Iijima, K.; Igawa, Y.; Wyndaele, J. J. *et al.* (2009). "Mechanosensitive primary bladder afferent activity in rats with and without spinal cord transection." J Urol **182**(5): 2504-10.
- Jain, A.; Kim, Y. T.; McKeon, R. J. *et al.* (2006). "In situ gelling hydrogels for conformal repair of spinal cord defects, and local delivery of BDNF after spinal cord injury." Biomaterials **27**(3): 497-504.

- Jakeman, L. B.; Wei, P.; Guan, Z. *et al.* (1998). "Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury." Exp Neurol **154**(1): 170-84.
- Kabatas, S.; Yu, D.; He, X. D. *et al.* (2008). "Neural and anatomical abnormalities of the gastrointestinal system resulting from contusion spinal cord injury." Neuroscience **154**(4): 1627-38.
- Kadoyama, K.; Funakoshi, H.; Ohya, W. *et al.* (2007). "Hepatocyte growth factor (HGF) attenuates gliosis and motoneuronal degeneration in the brainstem motor nuclei of a transgenic mouse model of ALS." Neurosci Res **59**(4): 446-56.
- Kang, S. K.; Shin, M. J.; Jung, J. S. *et al.* (2006). "Autologous adipose tissue-derived stromal cells for treatment of spinal cord injury." Stem Cells Dev **15**(4): 583-94.
- Kang, S. K.; Yeo, J. E.; Kang, K. S. *et al.* (2007). "Cytoplasmic extracts from adipose tissue stromal cells alleviates secondary damage by modulating apoptosis and promotes functional recovery following spinal cord injury." Brain Pathol **17**(3): 263-75.
- Kern, S.; Eichler, H.; Stoeve, J. *et al.* (2006). "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue." Stem Cells **24**(5): 1294-301.
- Kikukawa, S.; Kawaguchi, S.; Mizoguchi, A. *et al.* (1998). "Regeneration of dorsal column axons after spinal cord injury in young rats." Neurosci Lett **249**(2-3): 135-8.

- Kim, S. and Kwak, H. (2007). "The Effects of Human Adipose Tissue–Derived Mesenchymal Stem Cells Transplantation on Neurologic Recovery in Rats With Spinal Cord Injury." Arch Phys Med Rehabil **88** (9): E91.
- Ko, J.; Chang, Y.; Shin, H. *et al.* (2006). "Locomotor Improvement and Lesion Specificity After Transplantation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Spinal Cord Injured Rats." Arch Phys Med Rehabil. **87** (11): e45.
- Lee, J. W.; Furmanski, O.; Castellanos, D. A. *et al.* (2008). "Prolonged nociceptive responses to hind paw formalin injection in rats with a spinal cord injury." Neurosci Lett **439**(2): 212-5.
- Lee, O. K. (2008). "Fibrin glue as a vehicle for mesenchymal stem cell delivery in bone regeneration." J Chin Med Assoc **71**(2): 59-61.
- Leung, P. Y.; Johnson, C. S. and Wrathall, J. R. (2007). "Comparison of the effects of complete and incomplete spinal cord injury on lower urinary tract function as evaluated in unanesthetized rats." Exp Neurol **208**(1): 80-91.
- Levine, E. S.; Dreyfus, C. F.; Black, I. B. *et al.* (1995). "Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 8074-7.
- Levy, Y. S.; Merims, D.; Panet, H. *et al.* (2003). "Induction of neuron-specific enolase promoter and neuronal markers in differentiated mouse bone marrow stromal cells." J Mol Neurosci **21**(2): 121-32.
- Liu, Z.; Li, Y.; Qu, R. *et al.* (2007). "Axonal sprouting into the denervated spinal cord and synaptic and postsynaptic protein expression in the spinal cord

after transplantation of bone marrow stromal cell in stroke rats." Brain Res **1149**: 172-80.

Lopez-Vales, R.; Fores, J.; Verdu, E. *et al.* (2006). "Acute and delayed transplantation of olfactory ensheathing cells promote partial recovery after complete transection of the spinal cord." Neurobiol Dis **21**(1): 57-68.

Lu, J.; Feron, F.; Ho, S. M. *et al.* (2001). "Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats." Brain Res **889**(1-2): 344-57.

Lu, P.; Jones, L. L. and Tuszynski, M. H. (2005). "BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury." Exp Neurol **191**(2): 344-60.

Maitra, B.; Szekely, E.; Gjini, K. *et al.* (2004). "Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation." Bone Marrow Transplant **33**(6): 597-604.

Mansilla, E.; Marin, G. H.; Sturla, F. *et al.* (2005). "Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries." Transplant Proc **37**(1): 292-4.

Mareschi, K.; Novara, M.; Rustichelli, D. *et al.* (2006). "Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: Evidence for expression of neural markers and eag K⁺ channel types." Exp Hematol **34**(11): 1563-72.

Massey, J. M.; Amps, J.; Viapiano, M. S. *et al.* (2008). "Increased chondroitin sulfate proteoglycan expression in denervated brainstem targets following spinal cord injury creates a barrier to axonal regeneration overcome by chondroitinase ABC and neurotrophin-3." Exp Neurol **209**(2): 426-45.

- Matsumoto, R.; Omura, T.; Yoshiyama, M. *et al.* (2005). "Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(6): 1168-73.
- Medeiros, B. A.; dos Santos, C. L.; Palheta, R. C., Jr. *et al.* (2008). "Spinal cord transection modifies ileal fluid and electrolyte transport in rats." Auton Neurosci **139**(1-2): 24-9.
- Menei, P.; Montero-Menei, C.; Whittemore, S. R. *et al.* (1998). "Schwann cells genetically modified to secrete human BDNF promote enhanced axonal regrowth across transected adult rat spinal cord." Eur J Neurosci **10**(2): 607-21.
- Mezey, E.; Key, S.; Vogelsang, G. *et al.* (2003). "Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 1364-9.
- Miller, R. H.; Bai, L.; Lennon, D. P. *et al.* (2010). "The potential of mesenchymal stem cells for neural repair." Discov Med **9**(46): 236-42.
- Mimeault, M. and Batra, S. K. (2006). "Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies." Stem Cells **24**(11): 2319-45.
- Morgan, C.; Nadelhaft, I. and de Groat, W. C. (1981). "The distribution of visceral primary afferents from the pelvic nerve to Lissauer's tract and the spinal gray matter and its relationship to the sacral parasympathetic nucleus." J Comp Neurol **201**(3): 415-40.

- Murray, M.; Fischer, I.; Smeraski, C. *et al.* (2004). "Towards a definition of recovery of function." J Neurotrauma **21**(4): 405-13.
- Nakamura, M.; Houghtling, R. A.; MacArthur, L. *et al.* (2003). "Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord." Exp Neurol **184**(1): 313-25.
- Oh, J. S.; Ha, Y.; An, S. S. *et al.* (2010). "Hypoxia-preconditioned adipose tissue-derived mesenchymal stem cell increase the survival and gene expression of engineered neural stem cells in a spinal cord injury model." Neurosci Lett **472**(3): 215-9.
- Osaka, M.; Honmou, O.; Murakami, T. *et al.* (2010). "Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome." Brain Res **1343**: 226-35.
- Oudega, M. and Hagg, T. (1999). "Neurotrophins promote regeneration of sensory axons in the adult rat spinal cord." Brain Res **818**(2): 431-8.
- Pan, W.; Yu, Y.; Yemane, R. *et al.* (2006). "Permeation of hepatocyte growth factor across the blood-brain barrier." Exp Neurol **201**(1): 99-104.
- Patel, K. M.; Crisostomo, P.; Lahm, T. *et al.* (2007). "Mesenchymal stem cells attenuate hypoxic pulmonary vasoconstriction by a paracrine mechanism." J Surg Res **143**(2): 281-5.
- Quintero, L.; Chaparro, O. and Beltrán, O. (2007). Caracterización de células stem mesenquimales de médula ósea humana.
- Raineteau, O. (2008). "Plastic responses to spinal cord injury." Behav Brain Res **192**(1): 114-23.

- Ramon-Cueto, A.; Cordero, M. I.; Santos-Benito, F. F. *et al.* (2000). "Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia." Neuron **25**(2): 425-35.
- Rao, M. S.; Noble, M. and Mayer-Proschel, M. (1998). "A tripotential glial precursor cell is present in the developing spinal cord." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3996-4001.
- Rattigan, Y.; Hsu, J. M.; Mishra, P. J. *et al.* (2010). "Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu." Exp Cell Res.
- Restrepo, S. (2009). Secreción de factores angiogénicos en condiciones de normoxia e hipoxia en células stem mesenquimales humanas derivadas de médula ósea y tejido adiposo. Maestría en Microbiología. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia.
- Rickmann, M. and Wolff, J. R. (1995). "S100 protein expression in subpopulations of neurons of rat brain." Neuroscience **67**(4): 977-91.
- Rodríguez, S. (2002). "Red de Solidaridad Social, Comunicación personal."
- Rolls, A.; Shechter, R. and Schwartz, M. (2009). " The bright side of the glial scar in CNS repair." Nat Rev Neurosci **10**(1): 235-241
- Roorda, B. D.; ter Elst, A.; Kamps, W. A. *et al.* (2009). "Bone marrow-derived cells and tumor growth: contribution of bone marrow-derived cells to tumor micro-environments with special focus on mesenchymal stem cells." Crit Rev Oncol Hematol **69**(3): 187-98.

- Sedy, J.; Urdzikova, L.; Jendelova, P. *et al.* (2008). "Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats." Neurosci Biobehav Rev **32**(3): 550-80.
- Shen, J.; Zhong, X. M.; Duan, X. H. *et al.* (2009). "Magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells labeled with dual (MR and fluorescence) agents in rat spinal cord injury." Acad Radiol **16**(9): 1142-54.
- Shi, E.; Jiang, X.; Kazui, T. *et al.* (2006). "Nonviral gene transfer of hepatocyte growth factor attenuates neurologic injury after spinal cord ischemia in rabbits." J Thorac Cardiovasc Surg **132**(4): 941-7.
- Siegel, G.; Agranoff, B.; Fisher, S. *et al.* (1999). molecular, cellular and medical aspects. Basic Neurochemistry. Lippincott; Williams and Wilkins, 6 ed.
- Smith-Thomas, L. C.; Stevens, J.; Fok-Seang, J. *et al.* (1995). "Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors." J Cell Sci **108 (Pt 3)**: 1307-15.
- Soril, L. J.; Ramer, L. M.; McPhail, L. T. *et al.* (2008). "Spinal brain-derived neurotrophic factor governs neuroplasticity and recovery from cold-hypersensitivity following dorsal rhizotomy." Pain **138**(1): 98-110.
- Terayama, R.; Bando, Y.; Murakami, K. *et al.* (2007). "Neurotrophin promotes oligodendrocyte death, demyelination and axonal degeneration after spinal cord injury." Neuroscience **148**(1): 175-87.
- Thuret, S.; Moon, L. D. and Gage, F. H. (2006). "Therapeutic interventions after spinal cord injury." Nat Rev Neurosci **7**(8): 628-43.

- Tillakaratne, N. J.; Guu, J. J.; de Leon, R. D. *et al.* (2010). "Functional recovery of stepping in rats after a complete neonatal spinal cord transection is not due to regrowth across the lesion site." Neuroscience **166**(1): 23-33.
- Tyndall, A. and Uccelli, A. (2009). "Multipotent mesenchymal stromal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks." Bone Marrow Transplant **43**(11): 821-8.
- Uccelli, A.; Mancardi, G. and Chiesa, S. (2008). "Is there a role for mesenchymal stem cells in autoimmune diseases?" Autoimmunity **41**(8): 592-5.
- Uccelli, A.; Moretta, L. and Pistoia, V. (2006). "Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells." Eur J Immunol **36**(10): 2566-73.
- Uccelli, A.; Pistoia, V. and Moretta, L. (2007). "Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression?" Trends Immunol **28**(5): 219-26.
- van Poll, D.; Parekkadan, B.; Rinkes, B. *et al.* (2008). "Mesenchymal Stem Cell Therapy for Protection and Repair of Injured Vital Organs." Cell Mol Bioeng **1**(1): 42–50
- Vats, A.; Tolley, N. S.; Polak, J. M. *et al.* (2002). "Stem cells: sources and applications." Clin Otolaryngol Allied Sci **27**(4): 227-32.
- Walter, M. N.; Wright, K. T.; Fuller, H. R. *et al.* (2010). "Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays." Exp Cell Res **316**(7): 1271-81.
- Wang, X.H. and M.M. Poo, (1997) "Potentiation of developing synapses by postsynaptic release of neurotrophin-4". Neuron **19**(4): p. 825-35.

- Wehrman, T.; He, X.; Raab, B. *et al.* (2007). "Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors." Neuron **53**(1): p. 25-38.
- Willerth, S. M. and Sakiyama-Elbert, S. E. (2008). "Cell therapy for spinal cord regeneration." Adv Drug Deliv Rev **60**(2): 263-76.
- Willis, William D. and Coggeshall, Richard E. (1991). Sensory mechanisms of the spinal cord. Springer, 2 ed.: 575.
- Windle, W. F. and Chambers, W. W. (1950). "Regeneration in the spinal cord of the cat and dog." J Comp Neurol **93**(2): 241-57.
- Wislet-Gendebien, S.; Bruyere, F.; Hans, G. *et al.* (2004). "Nestin-positive mesenchymal stem cells favour the astroglial lineage in neural progenitors and stem cells by releasing active BMP4." BMC Neurosci **5**: 33.
- Yan, Q.; Ruan, J. W.; Ding, Y. *et al.* (2009). "Electro-acupuncture promotes differentiation of mesenchymal stem cells, regeneration of nerve fibers and partial functional recovery after spinal cord injury." Exp Toxicol Pathol.
- Yang, C. C.; Shih, Y. H.; Ko, M. H. *et al.* (2008). "Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord." PLoS One **3**(10): e3336.
- Yang, L. Y.; Liu, X. M.; Sun, B. *et al.* (2004). "Adipose tissue-derived stromal cells express neuronal phenotypes." Chin Med J (Engl) **117**(3): 425-9.

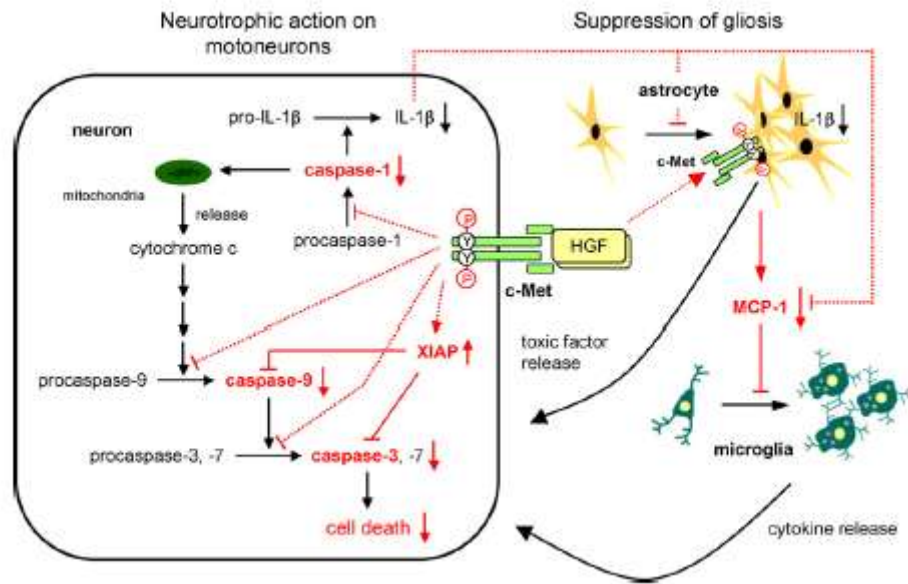
Ying, Z.; Roy, R. R.; Edgerton, V. R. *et al.* (2005). "Exercise restores levels of neurotrophins and synaptic plasticity following spinal cord injury." Exp Neurol **193**(2): 411-9.

ANEXO 1

0	No observable hindlimb movement
1	Slight movement of one or two joints, usually the hip and/or knee
2	Extensive movement of one joint or extensive movement of one joint and slight movement of one other joint
3	Extensive movement of two joints
4	Slight movement of all three joints of the HL
5	Slight movement of two joints and extensive movement of the third
6	Extensive movement of two joints and slight movement of the third
7	Extensive movement of all three joints of the HL
8	Sweeping with no weight support or plantar placement of the paw with no weight support
9	Plantar placement of the paw with weight support in stance only (i.e. when stationary) or occasional, frequent or consistent weight-supported dorsal stepping and no plantar stepping
10	Occasional weight-supported plantar steps; no FL–HL coordination
11	Frequent to consistent weight-supported plantar steps and no FL–HL coordination
12	Frequent to consistent weight-supported plantar steps and occasional FL–HL coordination
13	Frequent to consistent weight-supported plantar steps and frequent FL–HL coordination
14	Consistent weight-supported plantar steps; consistent FL–HL coordination, and predominant paw position during locomotion is rotated (internally or externally) when it makes initial contact with the surface as well as just before it is lifted off at the end of stance; or frequent plantar stepping, consistent FL–HL coordination, and occasional dorsal stepping
15	Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination and no toe clearance or occasional toe clearance during forward limb advancement; predominant paw position is parallel to the body at initial contact
16	Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait and toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift-off
17	Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait and toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and lift-off
18	Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait and toe clearance occurs consistently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift-off
19	Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait, toe clearance occurs consistently during forward limb advancement, predominant paw position is parallel at initial contact and lift-off, and tail is down part or all of the time
20	Consistent plantar stepping and consistent coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel at initial contact and lift-off, and trunk instability; tail consistently up
21	Consistent plantar stepping and consistent gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel throughout stance, and consistent trunk stability; tail consistently up

Escala Basso, Beattie y Bresnahan

ANEXO 2



Vía señalización HGF