



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA



DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Facultad de Ciencias Biológicas

TERAPIA CELULAR EN ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES

TESIS DOCTORAL

Jesús Alfonso Jaramillo Merchán

Octubre 2019

DIRECTOR

Dr. Salvador Martínez Pérez

Catedrático de Anatomía y Embriología Humana de la Universidad Miguel Hernández

CODIRECTOR

Dr. Jonathan Richard Jones Barberá

Doctor en Biología Celular

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que directa o indirectamente han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Salvador Martínez por la dirección, asesoramiento y formación en el campo de la medicina regenerativa.

Al Dr. Joanthan Jones por la dirección y todas las aportaciones científicas a este proyecto.

Al Dr. Enrique Lanuza por su atenta dedicación en la tutoría de este trabajo y ser un referente científico desde el inicio de mi formación académica.

Al Dr. Emilio Geijo por la instrucción en la confección de los estudios de electrofisiología. Al Dr. Casanova por sus direcciones en el abordaje de la temática de la esclerosis múltiple. Al Dr. Constantino Sotelo y al Dr. Armengol por sus consejos y asistencia en los estudios de microscopía electrónica. Al Dr. Pertusa por sus enseñanzas en el campo de la estereología y análisis de imagen. Al Dr. Jose Luís Ivorra y a la Dra. M^a Dolores Moltó por poner los medios y la experiencia en los estudios de expresión génica.

A la Dra. Llamusí y a la Dra. Quiles por la formación en las técnicas de cultivo celular, cirugía e inmunofluorescencia, pero sobre todo a la ayuda en la toma de decisiones que han hecho realidad esta tesis.

A mi maestro Dr. Tineo, a quien le debo que la ciencia sea hoy parte de mi vida.

A Mónica Rodenas, M^a Jesús Arencibia, Carolina Redondo, Aurelia Torregrosa, Olga Bahamonde y al personal del animalario por su asistencia técnica en el trabajo de laboratorio.

A Almudena, Diego y a todos los miembros del laboratorio que directa o indirectamente han ayudado en el desarrollo de la investigación.

Por último, agradecer a Irene sus consejos y apoyo tanto en lo personal como en lo profesional durante los años de estudio. A mis hermanos por prestarme su ayuda siempre que la he necesitado.

A mis abuelos y a mis padres Antonia y José por su apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida. Por eso os dedico este trabajo, por creer en mi más que yo mismo.

Jesús.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN BFU2010-27326), DIGESIC-MEC BFU2008-00588, Ingenio 2010 MEC-CONSOLIDER CSD2007-00023, Beca Prometeo de la GVA 2009/028, ISCIII Cibersam y TERCEL (RD06/0010/0023), ELA Foundation, Fundación Diogenes-Gobierno de la Ciudad de Elche y Beca Fundació Gent per Gent 24 NEURO.

A mis Padres.

ABREVIATURAS

A

- A: Absorbancia.
- ACTB: Gen de la β -Actina.
- ADM: Adrenomedulina.
- AMV: Virus del Mosaico de la Alfalfa.
- APC: Célula Presentadora de antígeno.

B

- BAF312: Siponimod.
- BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro (Brain-Derived Neurotrophic Factor).
- bFGF/FGF2/FGF β : Factor de crecimiento de fibroblastos (basic Fibroblast Growth Factor).
- BHE: Barrera Hematoencefálica.

C

- Ca: Calcio.
- CA3: Cornu Ammonis región 3.
- CC: Cuerpo Calloso.
- CaCl₂: Cloruro de Calcio.
- CD: Cluster de Diferenciación.
- cDNA: DNA complementario.
- CG: Cíngulo.
- CMH: Células Madre Hematopoyéticas.
- CNTF: Factor neurotrófico ciliar (Ciliary Neurotrophic Factor).
- CPN: Células Progenitoras Neurales.
- CPO: Células Precursoras de Oligodendrocitos.
- CTL: Linfocito T citotóxico.

D

- DAB: Diaminobencidina.
- DAPI: 4,6'-Diamino-2-fenilindol.
- dATP: desoxiadenosin 5'-trifosfato.
- dCTP: desoxicitidina 5'-trifosfato.
- dGTP: desoxiguanosina 5'-trifosfato.
- dTTP: desoxitimidina 5'-trifosfato.
- DAB: 3,3'-diaminobencidina
- DEPC: Dietil Pirocarbonato.
- DF: Fórnix Dorsal.
- DMEM: Medio Eagle modificado según Dulbecco.
- DNA: Ácido desoxirribonucleico (Deoxiribonucleic Acid).

E

- EAE: Encefalomiелitis Autoinmune Experimental.
- EDSS: Escala Expandida del Estado de Discapacidad.

- EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético.
- EEC: European Economic Community.
- EM: Esclerosis Múltiple.
- EM PP: Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva.
- EM RR: Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente.
- EM SP: Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva.

F

- FLAIR: Secuencia Recuperación de Inversión Atenuada de Fluido.
- FTY720: Fingolimod.

G

- GCSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos (Granulocyte Colony-Stimulating Factor).
- GD: Giro Dentado.
- GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía (Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor).
- GFAP: Proteína fibrilar ácida de la glía (Glial Fibrillary Acidic Protein).
- GFP: Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein).
- GGF2: Factor de crecimiento glial tipo 2 (Glial Growth Factor 2).

H

- HBSS: Solución Salina Equilibrada de Hank.
- hPOL-SCs: Células Mesenquimales de la Pulpa Dental humana.
- HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos (Hepatocyte Growth Factor).
- HLA: Antígeno leucocitario humano (Human Leukocyte Antigen).
- hPOL-SCs: Células Mesenquimales del Ligamento Periodontal humano.

I

- IDO: Indolamina 2,3-dioxigenasa.
- Ig: Inmunoglobulina.
- IGF-1: Factor de crecimiento tipo 1 relacionado con la insulina (Insulin-like Growth Factor 1).
- IFN: Interferón.
- IL: Interleucina.
- iNOS: Sintasa de óxido nítrico inducible.

K

- KCl: Cloruro Potásico.

L

- LCR: Líquido Cefalorraquídeo.
- LIF: Factor de inhibición leucémico (Leukemian Inhibitory Factor).
- LMP: Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva.

M

- M: Molar.
- m/s: metros por segundo.
- MAG: Glicoproteína Asociada a Mielina (Myelin-Associated Glycoprotein).

- MBP: Proteína básica de mielina (Myelin Basic Protein).
- MCP1: Proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1 (monocyte chemoattractant protein1).
- MCSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos (Macrophage Colony-Stimulating Factor).
- Mg: Magnesio.
- $MgCl_2$: Cloruro de Magnesio.
- MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex).
- MMP: Metaloproteasa de matriz.
- MOG: Glicoproteína de mielina de Oligodendrocitos (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein).
- MSC: Células Mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells).

N

- Na: Sodio.
- $NaHCO_3$: Bicarbonato de Sodio.
- NaH_2PO_4 : Fosfato Monosódico.
- NaCl: Cloruro Sódico.
- NaOH: Hidróxido de Sodio.
- NG2: Antígeno Neural/Glial tipo 2.
- NGF: Factor de crecimiento nervioso (Nerve Growth Factor).
- NIH: National Institutes of Health.
- NK: Linfocitos asesinos naturales (Natural Killer).
- NO: Óxido Nítrico.
- NPG: N-Propil Gallato.
- NT3: Neurotrofina tipo 3.

O

- OG: Oligodendrocito.
- Olig2: Factor de transcripción oligodendrocítico tipo 2.
- OPV: Operado por voltaje (canal iónico).
- OsO_4 : Tetraóxido de Osmio.

P

- P0: Proteína Cero de Mielina.
- PB: Tampón Fosfato.
- PBS: Tampón fosfato salino.
- PC: Célula Plasmática.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).
- PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet Derived Growth Factor).
- PDGFR: Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- PE: Potenciales Evocados.
- PFA: Paraformaldehído.
- PGE2: Prostaglandina tipo E2.
- PLP: Proteína proteolipídica de mielina.
- PSA-NCAM: Molécula de adhesión celular neural (Polysialyted Neural Cell Adhesion Molecule).

R

- RMN: Resonancia Magnética Nuclear.
- RNA: Ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid).
- ROS: Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species).
- rpm: revoluciones por minuto.

S

- S1p-r: Receptor de la Esfingosina 1.
- SCF: Factor de célula madre (Stem Cell Factor).
- SDF1: Factor derivado del estroma tipo 1 (stromal derived factor 1).
- SNC: Sistema Nervioso Central.
- SNP: Sistema Nervioso Periférico.
- SVZ: Zona subventricular (Subventricular Zone).

T

- TAP: Proteína transportadora asociada al procesamiento de antígenos.
- TBE: Tris Borato- EDTA.
- TBS: Tampón Salino Tris.
- Tc: Linfocitos T Citotóxicos CD8+.
- TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante β 1 (Transforming Growth Factor β 1).
- Th: Linfocitos T Colaboradores (helper) CD4+.
- TNF: Factor de necrosis tumoral (Tumor Necrosis Factor).
- Tto: Tratamiento.

V

- VCAM: Molécula de adhesión celular vascular (Vascular Cell Adhesion Molecule).
- VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular (Vascular Endothelial Growth Factor).
- VLA-4: Very Late Antigen-4 Integrin.
- vs: versus.

W

- w/w: Porcentaje del peso por peso (% weight per weight).

Z

- ZSG: Zona Subgranular.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	11
INTRODUCCIÓN	15
1.- OLIGODENDROGLÍA Y VAINAS DE MIELINA	17
1.1.- Oligodendrocitos y Células de Schwann	17
1.2.- Vaina de Mielina	17
2.- CLASIFICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES	19
3. ESCLEROSIS MÚLTIPLE	20
3.1.- Concepto	20
3.2.- Epidemiología	20
3.3.- Etiología	21
3.4.- Curso Clínico	21
3.5.- Patogenia	23
3.5.1.- Fase Aguda	23
3.5.2.- Fase Progresiva	28
3.5.3.- Fisiología Axonal tras la Desmielinización	30
3.5.4.- Daño Oxidativo	30
3.6.- Factores Desencadenantes	32
3.7.- Diagnóstico	32
3.7.1.- Clínica	33
3.7.2.- Técnicas de Imagen	33
3.7.3.- Líquido Cefalorraquídeo	33
3.7.4.- Criterios de McDonald	35
3.7.5.- Otros	35
3.8.- Tratamiento	36
3.8.1.- Tratamiento del Brote	36
3.8.2.- Tratamientos Modificadores de la Enfermedad	37
3.8.3.- Tratamientos Sintomáticos	39

4.- REMIELINIZACIÓN EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE	40
4.1.- Nichos Neurogénicos en el SNC Adulto	41
4.1.1.- Zona Subventricular	41
4.1.2.- Giro Dentado	42
4.2.- Progenitores de Oligodendrocitos	43
4.3.- Desmielinización	45
4.4.- Fases de la Remielinización	46
4.4.1.- Regulación en el Reclutamiento de OPC	48
4.4.2.- Regulación de la Diferenciación de OPC	49
4.5.- Remielinización en el Contexto de la Esclerosis Múltiple	49
4.5.1.- Lesiones Agudas	50
4.5.2.- Lesiones Crónicas	51
4.6.- Fisiología de la Remielinización	52
5.- MODELOS EXPERIMENTALES DE DESMIELINIZACIÓN	53
5.1.- Modelos Autoinmunes	53
5.2.- Modelos Virales	54
5.3.- Modelos Genéticos	54
5.4.- Modelos Tóxicos	54
5.4.1.- Bromuro de Etidio	55
5.4.2.- Lisofosfatidilcolina	56
5.4.3.- Cuprizona	57
6.- TERAPIA CELULAR	56
6.1.- Generalidades	56
6.2.- Terapias de Reemplazo Celular	57
6.3.- Terapias de Estimulación de la Regeneración	59
6.4.- Células Mesenquimales	59
6.4.1.- Características	59
6.4.2.- Plasticidad y Secretoma	60
6.4.3.- Células mesenquimales derivadas de tejido dentario	61
6.4.4.- Potencial Terapéutico de las MSCs en EM	62

6.4.5.- Ensayos Clínicos y Medicina Regenerativa	63
6.5.- Vías de Administración	64
7.- FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS	66
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67
MATERIAL Y MÉTODOS	73
1.- LÍNEAS GENERALES	75
1.1.- Cronograma	75
1.2.- Grupos Experimentales	75
2.- MUESTRAS HUMANAS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	76
2.1.- Ratones	76
2.1.1.- Donantes de MSCs de la Médula Ósea	76
2.1.2.- Línea Celular 158N de Oligodendrocitos Inmortalizados	78
2.1.3.- Ratones Receptores del Trasplante de Céls. Murinas	78
2.1.4.- Ratones Receptores del Trasplante de Céls. Humanas	78
2.2.- Muestras Humanas	78
2.2.1.- Células Mesenquimales de la Pulpa Dental	79
2.2.2.- Células Mesenquimales del Ligamento Periodontal	79
3.- TRATAMIENTO DESMIELINIZANTE	79
4.- AISLAMIENTO Y ESTUDIO DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES	80
4.1.- Cultivos Primarios	80
4.2.- Estudio de Marcadores Mesenquimales	81
4.3.- Expresión de FGF8	83
4.4.- Estudio de Senescencia Celular	83
4.4.1.- β -Galactosidasa Asociada a Senescencia	84
4.4.2.- Inmunocitoquímica	84
4.5.- Estudio de la Expresión Génica de las MSC mediante PCR	85
4.5.1.- Lisis Celular y Aislamiento del RNA	85
4.5.2.- Control de Calidad y Pureza del RNA	86

4.5.3.- Retrotranscripción	86
4.5.4.- Amplificación mediante PCR	87
5.- CULTIVO DE LAS LÍNEAS 158N, hPOL-SC y hDP-SC	88
6.- PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS	89
6.1.- Elección de la Estructura a Trasplantar	89
6.2.- Preparación de las Células para Trasplante	90
6.3.- Preparación de las Bolas de Heparina Tratadas	90
6.4.- Procedimiento Quirúrgico	90
6.4.1.- Preparación Prequirúrgica	90
6.4.2.- Cirugía	91
6.4.3.- Reanimación	92
7.- HISTOLOGÍA	93
7.1.- Perfusión para Inmunofluorescencia	93
7.2.- Perfusión para Inmunohistoquímica	93
7.3.- Procesado del Tejido	93
7.4.- Obtención de Secciones	94
7.5.- Inmunofluorescencia	94
7.5.1.- Bloqueo de Uniones Inespecíficas	94
7.5.2.- Anticuerpos Primarios	95
7.5.3.- Anticuerpos Secundarios	96
7.5.4.- Marcaje Nuclear y Montaje	97
7.5.5.- Controles	97
7.6.- Inmunohistoquímica	97
7.6.1.- Bloqueo de Uniones Inespecíficas	97
7.6.2.- Anticuerpos Primarios	98
7.6.3.- Anticuerpos Secundarios	98
7.6.4.- Amplificado	98
7.6.5.- Revelado	99
7.6.6.- Montaje	99
7.6.7.- Controles	99

7.7.- Microscopios	99
8.- ANÁLISIS ELECTROFISIOLÓGICO	99
8.1.- Preparación de las Muestras	99
8.2.- Registros	100
9.- CULTIVO DE FIMBRIAS TRASPLANTADAS Y NEUROESFERAS	103
9.1.- Obtención de las muestras	103
9.2.- Encastración y cortado	103
9.3.- Cultivo	103
9.4.- Cultivo Secundario de Neuroesferas	104
10.- ESTUDIOS DE ULTRAESTRUCTURA	104
10.1.- Prefusión	104
10.2.- Postfijación y Deshidratación	104
10.3.- Inclusión en Resina	105
10.4.- Obtención de Secciones	105
10.5.- Tinción Azul de Toluidina y Montaje de Semifinos	105
10.6.- Microscopía Electrónica	106
10.7.- Disoluciones	106
11.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL	106
11.1.- Lisis Celular y Aislamiento Celular	107
11.2.- Control de Calidad	107
11.3.- Retrotranscripción	107
11.4.- Amplificado Mediante PCR a Tiempo Real	108
11.5.- Análisis de Resultados	109
12.- CUANTIFICACIÓN	110
12.1.- Expresión de NG2, GFAP y MBP	110
12.2.- Expresión de Factores Tróficos	111
12.3.- Diámetro Axonal y Grosor de Mielina	112
12.4.- Número y Densidad Celular en la SVZ	113
12.5.- Análisis Estadístico	113

RESULTADOS 115

SECCIÓN A: Trasplante de MSCs en la Médula Ósea 119

1.- LAS MSC TRASPLANTADAS PERMANECEN AGRUPADAS EN EL TEJIDO NERVIOSO DESMIELINIZADO. SON VIABLES Y NO NEUROGÉNICAS A LOS 90D DEL TRASPLANTE 121

1.1.- Características Histológicas de las MSCs Trasplantadas 121

1.2.- Capacidad neurogénica de las MSCs 123

1.3.- Viabilidad de las MSCs Trasplantadas 124

2.- EL TRASPLANTE DE CÉLULAS MESENQUIMALES ACTIVA LA OLIGODENDROGÉNESIS Y REMIELINIZACIÓN ENDÓGENA EN LA PERIFERIA DEL TRASPLANTE 125

2.1.- Análisis y Cuantificación de CPOs 125

2.2.- Análisis y Cuantificación de la Reacción Astroglial 129

2.3.- Análisis y Cuantificación de la Producción de Mielina 130

2.4.- Análisis del Potencial de Transdiferenciación 132

3.- EL TRASPLANTE DE CÉLULAS MESENQUIMALES AUMENTA LA VELOCIDAD DE CONDUCCIÓN EN LAS FIBRAS DESMIELINIZADAS 134

3.1.- Velocidad de Conducción 134

3.2.- Alteraciones Estructurales Axonales 136

3.2.1.- Diámetro Axonal 136

3.2.2.- Grosor de la Vaina de Mielina 136

3.2.3.- G-Ratio 137

4.- EL TRASPLANTE DE CÉLULAS MESENQUIMALES LIBERAN FACTORES IMPLICADOS EN PROLIFERACIÓN, SUPERVIVENCIA Y DIFERENCIACIÓN DE CPOs 138

4.1.- Secretoma de las MSCs en Cultivo 139

4.2.- Secretoma de las MSCs Trasplantadas 140

5.- LAS MSCs ESTIMULAN LA DIFERENCIACIÓN Y MIGRACIÓN OLIGODENDROGLIAL DESDE LA ZONA SUBPENDIMARIA Y GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO 142

5.1.- Zona Subependimaria 142

5.2.- Giro Dentado 146

6.- EL FGF8 ATRAE CPOs E INDUCE REMIELINIZACIÓN <i>in vivo</i>	151
6.1.- Estudio de la producción de FGF8 en las MSCs	151
6.2.- Capacidad de Respuesta de las CPO Frente a Señalización por FGF8	153
6.3.- Implicación de FGF8 en la Remielinización	154
6.3.1.- Análisis y Cuantificación de CPOs	155
6.3.2.- Análisis y Cuantificación de la Reacción Astroglial	157
6.3.3.- Análisis y Cuantificación de la Producción de Mielina	158

SECCIÓN B: Trasplante de Células Mesenquimales de la Pulpa Dental y Ligamento Periodontal **161**

1.- LAS CÉLULAS TRASPLANTADAS ADQUIEREN MORFOLOGÍA FUSIFORME Y MIGRAN HACIA ESTRATOS INFERIORES	163
2.- ESTUDIO DE MARCADORES CELULARES	165
2.1.- Estudio de Marcadores Mesenquimales	165
2.2.- Estudio de Marcadores Gliales	167
3.- LAS CÉLULAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL EXPRESAN MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN NEURORREGENERACIÓN PERO AL IGUAL QUE LAS CÉLULAS DE LA PULPA DENTAL, NO INCREMENTAN LA MIELINIZACIÓN DE LOS ANIMALES TRASPLANTADOS	168

SECCIÓN C: Trasplante de Oligodendrocitos Inmortalizados **171**

1.- LAS CÉLULAS 158N FORMAN UNA MASA CELULAR VASCULARIZADA E INVADE LA FIMBRIA Y ESTRUCTURAS VECINAS	173
2.- LAS CÉLULAS TRASPLANTADAS CONSERVAN SUS CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS BÁSICAS PREVIAS AL TRASPLANTE, PERO EXPRESAN GFAP Y TUJ1	174
3.- EL TRASPLANTE ACTIVA LA DIFERENCIACIÓN DE PROGENITORES NEURALES A CPOs Y PROMUEVEN SU MIGRACIÓN	176
4.- EL TRASPLANTE DE CÉLULAS 158N REMIELINIZA LA FIMBRIA TRASPLANTADA	179

DISCUSIÓN	181
1.- VIABILIDAD DEL TRASPLANTE DE MSCs DENTRO DE UN AMBIENTE NEURAL DESMIELINIZADO	184
2.- EL TRASPLANTE DE MSCs PROMUEVE REMIELINIZACIÓN MEDIANTE LA ATRACCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CPOs: CORRIENTE MIGRATORIA CAUDAL	185
2.1.- Sobre los Progenitores de Oligodendrocitos	185
2.2.- Sobre las Células Mesenquimales	189
2.3.- Sobre la Migración de CPOs	189
3.- RECUPERACIÓN FUNCIONAL DE LA ZONA DESMIELINIZADA TRAS EL TRASPLANTE DE MSCs	193
4.- FGF8 Y SU IMPLICACIÓN EN LA CAPACIDAD REMIELINIZANTE DE LAS MSC	196
5.- POTENCIAL REMIELINIZANTE DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES DEL LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO Y LA PULPA DENTAL HUMANA	198
6.- POTENCIAL REMIELINIZANTE DE OLIGODENDROCITOS INMORTALIZADOS. LÍNEA 158N	200
7.- COMENTARIOS ADICIONALES	201
7.1.- Respecto al Uso de MSCs frente otros Tipos Celulares	201
7.2.- Respecto al Tratamiento con FGF8	203
CONCLUSIONES	205
REFERENCIAS	209
ANEXOS:	237
ANEXO A.- Jaramillo-Merchan, J., Jones, J., Ivorra, J. L., Pastor, D., Viso-León, M. C., Armengol, J. A., Moltó, M. D., Geijo-Barrientos, E. and Martínez, S. (2013). Mesenchymal stromal-cell transplants induce oligodendrocyte progenitor migration and remyelination in a chronic demyelination model. <i>Cell Death and Disease</i> , 4, e779.	239
ANEXO B.- Cruz-Martinez, P., Martinez-Ferre, A., Jaramillo-Merchán, J., Estirado, A., Martinez, S. & Jones, J. (2014). FGF8 activates proliferation and migration in mouse post-natal oligodendrocyte progenitor cells. <i>PLoS One</i> , 9(9), e108241.	251
ANEXO C.- Aportaciones a Congresos y Jornadas Científicas.	259

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA I1: Vaina de Mielina	18 y 19
FIGURA I2: Formas Evolutivas de EM	22
FIGURA I3: Antígenos Diana en la Sustancia Blanca	23
FIGURA I4: Posibles Causas de Neuroinflamación	24
FIGURA I5: Fisiopatología en la Esclerosis Múltiple	25 y 26
FIGURA I6: Anatomía Patológica en EM	27 y 28
FIGURA I7: Folículos Linfoides Ectópicos en EM	29
FIGURA I8: Disfunción y Destrucción Neuronal tras Desmielinización	31
FIGURA I9: Imágenes de Resonancia Magnética en EM	34
FIGURA I10: Escala de Discapacidad EDSS de Kurtzke	36
FIGURA I11: Enfoques Terapéuticos en Inmunomodulación	39
FIGURA I12: Evolución de los Axones Desmielinizados	41
FIGURA I13: Células Madre y Células Progenitoras en el Cerebro Humano Adulto	42
FIGURA I14: Tipos de Progenitores y Células derivadas en el GD Embrionario y Adulto	43
FIGURA I15: Programa Oligodendrogénico	44
FIGURA I16: Lesión Axonal Durante la Desmielinización Inflamatoria	45
FIGURA I17: Remielinización	50
FIGURA I18: Patología de la Remielinización en EM	51 y 52
FIGURA I19: Ausencia de Remielinización Espontánea tras Desmielinización con Cuprizona	56
FIGURA I20: Efectos de la Administración Sistémica de MSC	65
FIGURA M1: Cronograma del Protocolo Experimental	75
FIGURA M2: Estudio Fenotípico de las MSC Trasplantadas	82
FIGURA M3: Reacción β -Galactosidasa Asociada a Senescencia	85
FIGURA M4: Control de Calidad de la Extracción de RNA	86
FIGURA M5: Procedimiento Quirúrgico	92
FIGURA M6: Extracción del Complejo Fimbria-Hipocampo	100
FIGURA M7: Registro de la Velocidad de Conducción I	101
FIGURA M8: Registro de la Velocidad de Conducción I I	102
FIGURA M9: Fundamento de la PCR en Tiempo Real mediante el uso de Sybr Green	108
FIGURA M10: Amplificado de la PCR en Tiempo Real	110
FIGURA M11: Cuantificación de la Expresión Molecular mediante Estereología	112
FIGURA R1: Efecto del Tratamiento Crónico con Cuprizona en el SNC	117
FIGURA R2: Trasplante de MSCs en la fimbria desmielinizada	122
FIGURA R3: Las MSC se pueden detectar en Áreas Vinculadas con la Fimbria	122 y 123
FIGURA R4: Análisis de la Capacidad Neurogénica de las MSCs	123 y 124
FIGURA R5: Viabilidad de las Células Trasplantadas I	124

FIGURA R6: Viabilidad de las Células Trasplantadas II	125
FIGURA R7: Colonización de CPO Alrededor del Trasplante I	125 y 126
FIGURA R8: Colonización de CPO Alrededor del Trasplante II	126 y 127
FIGURA R9: Cuantificación de la Expresión de NG2	128
FIGURA R10: Cuantificación de la Expresión de GFAP	129
FIGURA R11: Formación de Mielina en la Periferia del Trasplante de MSC	130
FIGURA R12: Cuantificación de la Expresión de MBP	131
FIGURA R13: Potencial de Transdiferenciación de las MSCs	133
FIGURA R14: Patrón Electrofisiológico de la Fimbria	134
FIGURA R15: Velocidad de Conducción del Potencial de Acción Axonal	135 y 136
FIGURA R16: Alteraciones Estructurales Axonales	137 y 138
FIGURA R17: Análisis Transcripcional de las MSC en Cultivo	139 y 140
FIGURA R18: Análisis Inmunohistoquímico de Varios Factores Tróficos	140 y 141
FIGURA R19: Análisis de Expresión de FGF2 e IGF mediante PCR en Tiempo Real	142
FIGURA R20: Zona Subventricular	143 y 144
FIGURA R21: Migración de CPO hacia el Trasplante	145 y 146
FIGURA R22: Origen de las CPOs	147
FIGURA R23: Intensidad del Marcaje de MBP según su Proximidad al GD	148
FIGURA R24: Giro Dentado I	149
FIGURA R25: Giro Dentado II	150 y 151
FIGURA R26: Expresión de FGF8 en las MSCs	151 y 152
FIGURA R27: Cuantificación de la Producción de FGF8	153 y 154
FIGURA R28: Expresión del Metabolito de la Ruta de Señalización de FGF8 P-ERK	155
FIGURA R29: Atracción de CPOs inducida por FGF8	156 y 157
FIGURA R30: Reacción Astroglial inducida por FGF8	157 y 158
FIGURA R31: Remielinización inducida por FGF8	158 y 159
FIGURA R32: Características de las Céls. Trasplantadas: Localización y Supervivencia	164
FIGURA R33: Características de las Céls. Trasplantadas: Migración	164 y 165
FIGURA R34: Matriz de origen Mesenquimal	165 y 166
FIGURA R35: Estudio de Marcadores Gliales	167 y 168
FIGURA R36: Potencialidad Remielinizante del Trasplante I	168 y 169
FIGURA R37: Potencialidad Remielinizante del Trasplante II	169
FIGURA R38: Propiedades Neuroregeneradoras de las Céls del Ligamento Periodontal	170
FIGURA R39: Características del Trasplante de Oligodendrocitos 158N	173 y 174
FIGURA R40: Características Inmunohistoquímicas del Trasplante 158N I	174 y 175
FIGURA R41: Características Inmunohistoquímicas del Trasplante 158N II	175 y 176
FIGURA R42: Activación y Migración de Progenitores Neurales	177
FIGURA R43: Remielinización de la Zona Trasplantada	178 y 179

FIGURA D1: Corriente Migratoria Caudal	191
FIGURA D2: Hipótesis Variaciones Diámetro Axonal y Grosor de la Vaina de Mielina	195
FIGURA D3: Comparación de la Remielinización entre los Distintos Tratamientos	203

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I1: Inmunopatogenia de la EM	26
TABLA I2: Efecto de los Factores de Crecimiento en el Linaje Oligodendrocítico	47
TABLA I3: Programa Oligodendrogénico	48
TABLA I4: Factores Solubles Secretados por las MSC. Secretoma	61
TABLA M1: Esquema de las Secciones y Grupos Experimentales	77
TABLA M2: Secuencia de los Cebadores para la Q-PCR	88
TABLA M3: Secuencia de cebadores para la PCR en Tiempo Real	109

INTRODUCCIÓN

1.- OLIGODENDROGLÍA Y VAINAS DE MIELINA.

1.1.- OLIGODENDROCITOS Y CÉLULAS DE SCHWANN.

Los oligodendrocitos y las células de Schwann son las células responsables de la formación de las vainas de mielina alrededor de los axones (Herbert & Monk, 2017):

- Los Oligodendrocitos derivan del neuroepitelio de las áreas ventriculares del cerebro y médula espinal desde donde migran a sus destinos finales para diferenciarse a células maduras con capacidad mielinizante. Están confinadas en el sistema nervioso central (SNC). Presentan un cuerpo celular esférico o poligonal con un núcleo pequeño, regular y cromófilo que emite prolongaciones escasas y cortas que contactan cada una con un axón para formar una lámina alargada que se empaqueta alrededor de éste formando la vaina de mielina (Figura 11A).

- Las Células de Schwann derivan de la cresta neural y su presencia se limita al sistema nervioso periférico (SNP). Cada célula envuelve un solo fragmento de axón periférico, terminales axónicos o botones sinápticos, pudiendo ser células mielinizantes que envuelven axones de tamaño superior a 1µm o no mielinizantes envolviendo a varios axones de diámetro pequeño (Figura 11B).

1.2.- VAINA DE MIELINA.

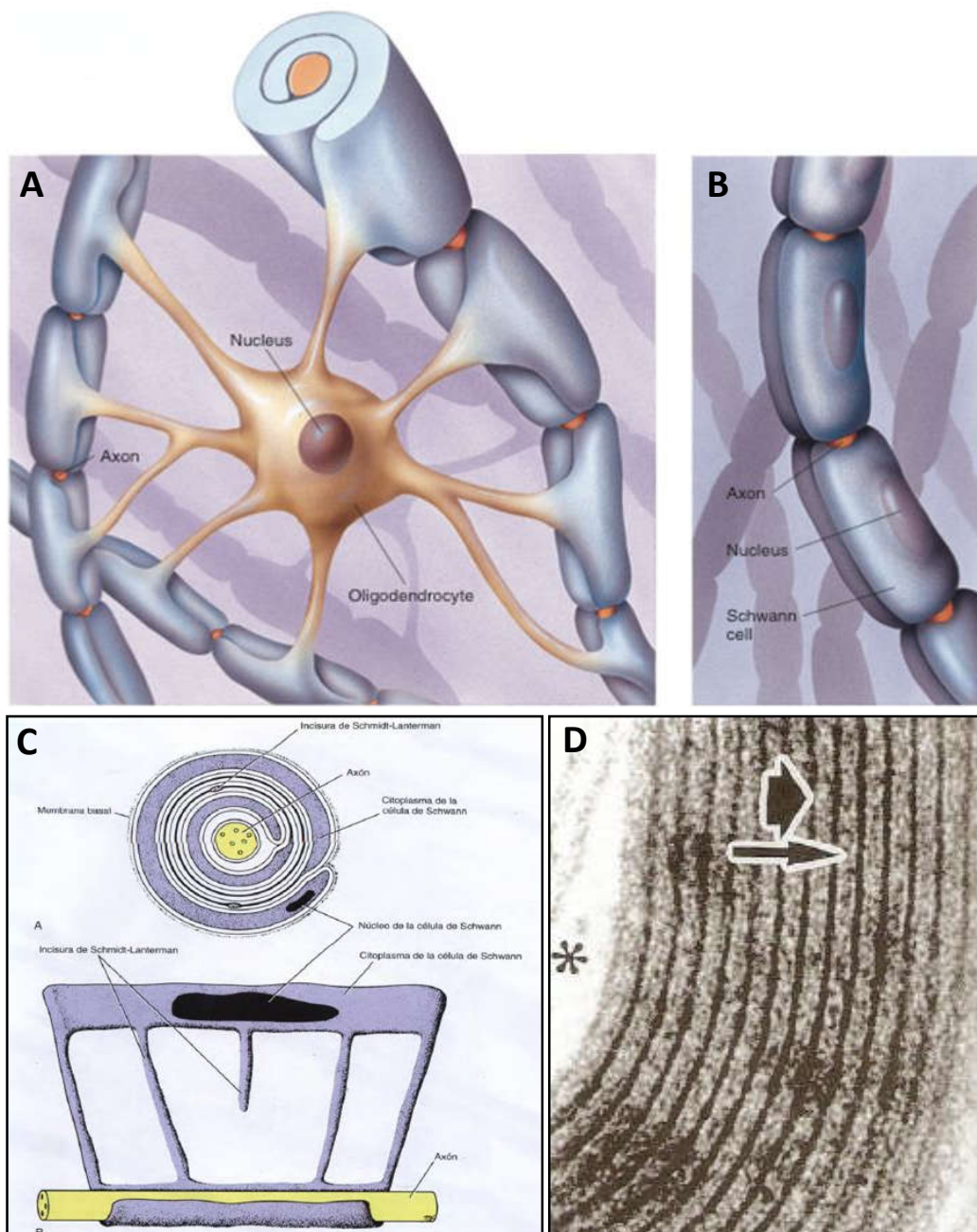
La velocidad de transmisión del impulso nervioso puede aumentar mediante dos mecanismos:

- Incrementando el diámetro del axón reduciendo de esta forma la resistencia interna a la corriente de iones.

- Aislando la membrana axonal mediante una envoltura mielínica, lo cual disminuye la capacitancia de la membrana axonal permitiendo incrementar la velocidad de conducción sin incrementar el diámetro axonal.

Fisiológicamente, la mielina aísla iónicamente la membrana axonal restringiendo la presencia de los canales de sodio únicamente en los anillos que quedan entre vainas de mielina (nodos de Ranvier). La concentración de los canales en los nodos es cuatro veces superior a lo que existe en un axón amielínico. Mediante este sistema, para transmitir el impulso nervioso no es necesario despolarizar el axón por completo, sino que los potenciales de acción únicamente se van a producir en los nodos de Ranvier siempre que los nodos se encuentran en el área de influencia iónica del nodo anterior. Además, este sistema permite ahorrar energía al restablecer el potencial de reposo mediante la bomba Na^+/K^+ solo en estos puntos.

Histológicamente la mielina es una espiral multilaminar de membrana especializada de oligodendrocitos o células de Schwann. Durante su formación una lengüeta de la membrana de oligodendrocito o célula de Schwann entra en contacto con un axón y lo envuelve un determinado número de vueltas. Durante este proceso las membranas externas que entran en contacto se adhieren entre sí quedando una pequeña cantidad de citoplasma en el interior de la lengüeta. Posteriormente el citoplasma se elimina excepto en las regiones paranodales y en las cisuras de Schmidt-Lantermann de las células de Schwann (Figura 11C). En este proceso las caras citoplasmáticas se unen fuertemente observándose al microscopio electrónico como una banda gruesa que se denomina Línea Densa Mayor. Las dos caras externas de la membrana plasmática en contacto forman la Línea Intraperiódica (Figura 11D). El número de vueltas de la vaina de mielina alrededor de axón es proporcional a la velocidad de transmisión del mismo (Snaidero et al., 2014).



◀ **Figura I1** (Página anterior): **Vaina de Mielina.**

(A, B): La vaina de mielina es una estructura membranosa especializada sintetizada por los oligodendrocitos que emiten prolongaciones para recubrir varios segmentos de varios axones del SNC (A); y por las células de Schwann donde cada célula recubre únicamente un segmento de axón del SNP (B).

(C): Durante la formación de la vaina de mielina, una lengüeta de membrana se arrolla alrededor del axón y extruye el citoplasma exceptuando las regiones paranodales y las cisuras de Schmidt-Lantermann.

(D): Imagen de microscopía electrónica de una vaina de mielina alrededor de un axón (asterisco). En la compactación, las caras citoplasmáticas de la membrana se unen fuertemente originando la Línea Densa Mayor (flecha gruesa), mientras que las caras externas en contacto forman la Línea Intraperiódica (flecha fina).

Molecularmente, su composición es rica en lípidos (70-85% del peso seco) y proteínas (15-30% del peso seco) con bajo contenido acuoso (40% en condiciones normales). Los lípidos mayoritarios son el galactocerebrósido y la esfingomielina. Las proteínas mayoritarias son la proteína básica de mielina (MBP) responsable del empaquetamiento de las membranas citoplasmáticas, y la proteína proteolípídica (PLP) o la proteína cero (P0), ambas proteínas transmembrana que intervienen en la adhesión de las membranas externas en el SNC o en el SNP respectivamente. La mielina también está compuesta por la proteína periférica de mielina 22 (PMP-22), la glicoproteína asociada a mielina (MAG) y la proteína asociada a oligodendrocitos (MOG) (Aggarwal et al., 2011).

2.- CLASIFICACIÓN DE LAS ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES.

Las enfermedades desmielinizantes son un conjunto de entidades que se caracterizan por la pérdida o malformación de la vaina de mielina que pueden asociar daño axonal. Esta desmielinización puede ocurrir tanto en los axones del SNC como del SNP.

Las enfermedades que afectan la mielina se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- **Enfermedades propiamente Desmielinizantes:** comprende aquellas de base inflamatoria o autoinmune, entre ellas la Enfermedad de Devic o Neuromielitis Óptica, la Esclerosis Múltiple (EM) y sus formas relacionadas como la EM Maligna o Enfermedad de Marburg, la Esclerosis Mielinoclástica Difusa o Enfermedad de Schilder, la EM Concéntrica de Balo, y otros síndromes aislados como la Leucoencefalitis Aguda Hemorrágica de Hurst, la Encefalomiелitis Aguda Desmielinizante y las Mielopatías Inflamatorias.

- **Enfermedades Dismielinizantes:** son de origen tóxico-metabólico. Entre ellas la Mielinosis Central Pontina, la Enfermedad de Marchifava-Bignani y la Leucoencefalopatía Posterior Reversible de causa medicamentosa. También se incluyen en este grupo las de origen genético como la Adrenoleucodistrofia, la Leucodistrofia Metacromática, la Enfermedad de Alexander, la

Enfermedad de Krabbe, la Enfermedad de Canavan, la Enfermedad de Pelizaeus-Merbacher y la Enfermedad Evanesciente de la Sustancia Blanca.

3.- ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

3.1.- CONCEPTO.

La EM es una enfermedad inflamatoria crónica del cerebro y médula espinal, de origen desconocido que afecta a adultos jóvenes. Se caracteriza por una afectación multifocal de oligodendrocitos, astrocitos, neuronas y axones cuya consecuencia es la aparición de placas de desmielinización de la sustancia blanca y posteriormente de la sustancia gris. A la vez, existe una afectación axonal y neuronal independiente o secundaria al proceso desmielinizante que es la responsable de los déficits neurológicos permanentes de la enfermedad.

La descripción más antigua conocida de una persona con síntomas de esclerosis múltiple data del siglo XIV en Holanda. En 1868 Charcot realizó la primera descripción detallada de los aspectos clínicos y evolutivos de la enfermedad denominándola Esclerosis en Placas. Posteriormente se le acuñó el nombre de Esclerosis Diseminada por la diseminación de las lesiones en el SNC. Finalmente se introdujo su denominación actual de EM por la aparición de lesiones múltiples en el SNC.

3.2.- EPIDEMIOLOGÍA.

La EM es la enfermedad crónica inflamatoria neurodegenerativa más común del SNC. Pese a esto, es una enfermedad poco frecuente que afecta al 0.1% de la población general de países occidentales, incrementándose al 3-5% en familiares de primer grado de un paciente afecto, e incluso al 30% si ambos padres están afectados. La concordancia entre gemelos monocigóticos es del 40%, mientras que en gemelos dicigóticos el riesgo es similar a lo esperado en familiares de primer grado (Noseworthy et al., 2000).

La prevalencia en España es de 80 casos por 100.000 habitantes con una incidencia de 4,2 casos anuales por 100.000 habitantes y una mortalidad por la enfermedad de 0.37 fallecimientos/100.000 hab/año. A nivel mundial la prevalencia aumenta proporcionalmente a la distancia al ecuador, tanto hacia el hemisferio Norte como hacia el Sur, siendo consideradas regiones de alto riesgo el sur de Canadá (313 casos por 100.000 habitantes en Saskatchewan), el norte de Estados Unidos, las islas Británicas (248 casos por 100.000 habitantes en Escocia del norte) y Escandinavia (Pérez-Carmona et al., 2019).

En el 90% de los casos la edad de presentación varía entre los 25 a 35 años, aunque hay descrito casos en edades extremas (desde los 2 a los 75 años). La distinción por sexos es de 2:1 con mayor afectación de mujeres (Milo & Miller, 2014).

3.3.- ETIOLOGIA.

Aunque su origen continúa siendo desconocido, se cree que existe una combinación de un factor ambiental como puede ser una infección por el virus del sarampión, varicela zóster, herpes 6, Epstein-Barr o Clamidias antes de los 15 años, al que se le añade un factor genético de susceptibilidad de herencia poligénica (Agostini et al., 2018; Lassmann et al., 2011; Nexø BA et al., 2011; Sibley et al., 1985).

Los únicos genes que han sido asociados de forma consistente a la predisposición de sufrir EM son los alelos DR15, DQw6, DR2, DR3 y DR4, del antígeno leucocitario humano (HLA) de la clase II que codifican moléculas que participan en el reconocimiento de antígenos por los linfocitos T (Arnett et al., 2010; Olerup & Hillert, 1991; Uría, 2000). Otros genes que se cree están asociados, aunque ninguno de éstos de forma significativa, son los que codifican proteínas del complemento, proteínas transportadoras TAP, del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), del receptor de células T, de la cadena pesada de la inmunoglobulina, de la MBP, de varias interleucinas y citocinas, genes relacionados con la Vitamina D y de las Apolipoproteínas E, B, CII y H (Adibhatla et al., 2008; Ballerini et al., 2000; Niino et al., 2015).

3.4.- CURSO CLÍNICO.

La característica más relevante de la EM es su gran variabilidad en el curso y en la clínica, pues los síntomas y signos que muestra el paciente están determinados por la localización de las lesiones inflamatorias desmielinizantes.

Estas lesiones aparecen con mayor frecuencia en zonas perivasculares, periventriculares, del nervio y quiasma óptico, del tronco del encéfalo, de los pedúnculos cerebelosos y de la médula espinal. La afectación de estas áreas da lugar a debilidad, parestesias, alteraciones visuales, nistagmus, disartria, temblor intencional, ataxia, alteración de la sensibilidad profunda, disfunción vesical, paraparesia, dolor neuropático, alteraciones emocionales y en fases muy avanzadas deterioro intelectual. Estos síntomas pueden aparecer aisladamente o en combinación (Goldenberg, 2012; Milo & Miller, 2014).

Según el curso clínico se diferencian varias formas de EM (Goldenberg, 2012; Milo & Miller, 2014; Lucchinetti et al. 2000) (Figura I2):

- **EM Remitente Recurrente (EM-RR):** Se caracteriza por la aparición impredecible de episodios de disfunción neurológica asociadas a la aparición de lesiones focales inflamatorias en la sustancia blanca que se repiten cada cierto tiempo y que, se trate o no, presentan cierto grado de reversibilidad dejando, o no, secuelas funcionales neurológicas. Los síntomas comienzan a la edad de 25-35 años afectando al 80-90% de los pacientes (Kremenchutzky et al., 1999).

- **EM Secundaria Progresiva (EM-SP):** En el 50% de los pacientes del grupo anterior, tras 10-15 años del comienzo de la sintomatología los brotes tienden a disminuir de frecuencia. Sin embargo hay una progresión de la disfunción neurológica secundaria a una neurodegeneración difusa que afecta a todo el SNC con atrofia y pérdida de tejido cerebral que cursa con discapacidad no recuperable.

- **EM Primaria Progresiva (EM-PP):** Un 10% del total de los pacientes muestra desde el inicio un curso progresivo de la enfermedad en ausencia de brotes. La manifestación inicial más frecuente en esta forma es una paraparesia espástica progresiva de inicio a los 40-45 años. Dentro de ella se distinguen dos formas:

1) EM-PP con actividad inflamatoria: en la RMN se evidencian lesiones inflamatorias e incluso clínica propia de brote inflamatorio, por eso estos pacientes pueden beneficiarse de tratamientos con antiinflamatorios.

2) EM-PP sin actividad inflamatoria en el que no existe ningún tratamiento efectivo para frenar la progresión y donde la atrofia cerebral es más severa (Fox et al., 2000).

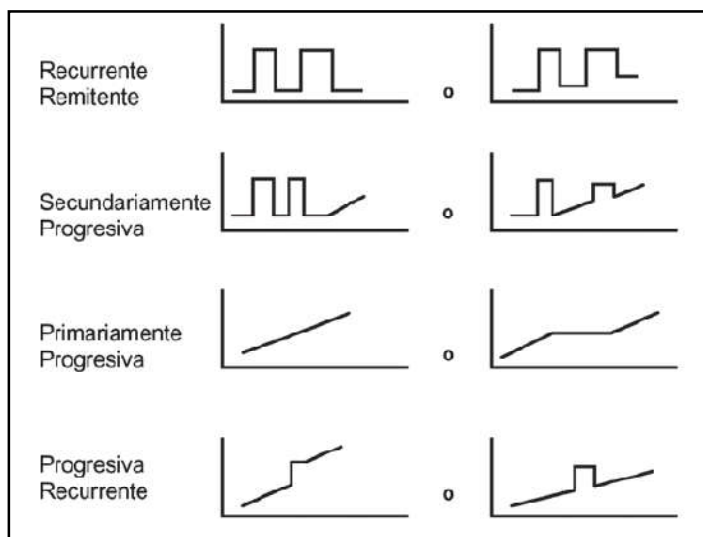


Figura I2: Formas evolutivas de la EM.

Remitente Recurrente: Se producen brotes impredecibles que pueden, o no, condicionar déficits neurológicos irreversibles, tras los cuales existen períodos de remisión.

Secundaria Progresiva: Es la evolución de la remitente recurrente en la que se incrementa la discapacidad sin períodos de remisión.

Primaria Progresiva: Progresivo aumento de discapacidad en ausencia de brotes.

Progresiva recurrente: Discapacidad progresiva con períodos de exacerbación sin recuperación (Lublin et al., 1996).

- Otras formas de presentación son: la enfermedad de Schilder en la que aparece una placa inflamatoria única sin efecto masa y produce ceguera en niños; la Encefalomiелitis Aguda Diseminada caracterizada por que todas las lesiones desmielinizantes están en el mismo estadio

evolutivo y aparece en niños tras ser vacunados o tras haber sufrido una infección; la enfermedad de Baló que inicia a los 25-35 años con una encefalopatía polisintomática en la que aparecen lesiones en bulbo de cebolla; o la enfermedad de Marburg con unas manifestaciones pseudotumorales en la Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

- Los síndromes clínicos desmielinizantes aislados del nervio óptico, médula espinal o del tronco del encéfalo también se incluyen como variantes de la EM debido a la alta predisposición a desarrollar una EM posterior.

3.5.- PATOGENIA.

3.5.1.- FASE AGUDA.

Se han aislado anticuerpos inmunorreactivos frente a antígenos de mielina (Figura I3) tanto en el SNC y en el suero de pacientes con EM como en personas sanas. Igualmente también se han aislado linfocitos T colaboradores (Th) CD4+ con especificidad frente a diversos antígenos de mielina tanto en pacientes con EM como en personas sanas, indicando que éstas células autorreactivas son propias del repertorio normal del sistema inmunológico.

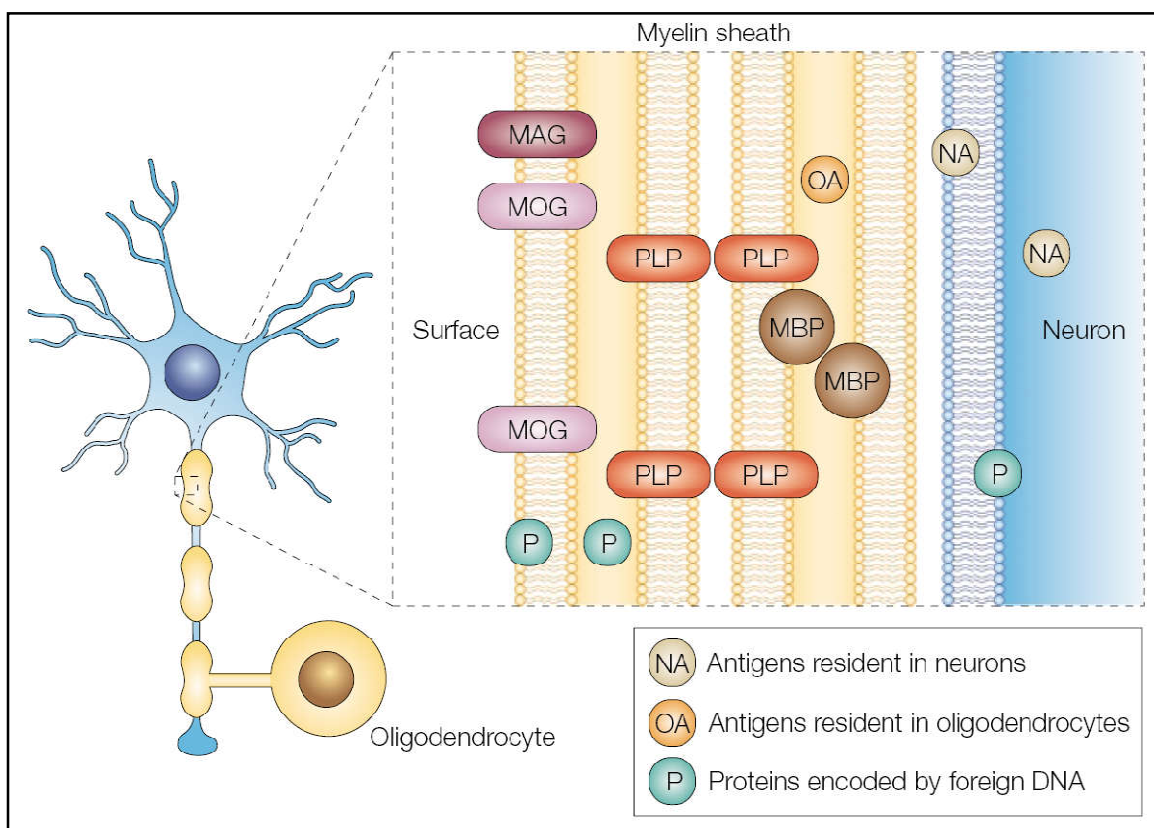


Figura I3: Antígenos diana en la sustancia blanca.

Las proteínas de mielina, oligodendrocitos y neuronas son posibles dianas en la respuesta inmune de la EM. También pueden estar implicadas proteínas introducidas en estas células por agentes infecciosos (Hemmer et al., 2002).

Además, éstas células T específicas para antígenos de mielina pueden tener reacciones cruzadas con péptidos virales (Benoist & Mathis, 2001), por lo que se postula que ante una infección viral, estas células pueden ser activadas desencadenando un proceso autoinmune. Tras esta primera lesión tisular inmunomediada, se liberan antígenos de mielina que pueden iniciar una cascada inmunológica frente a otros epítomos de mielina (Vanderlugt & Miller, 2002) (Figura 14).

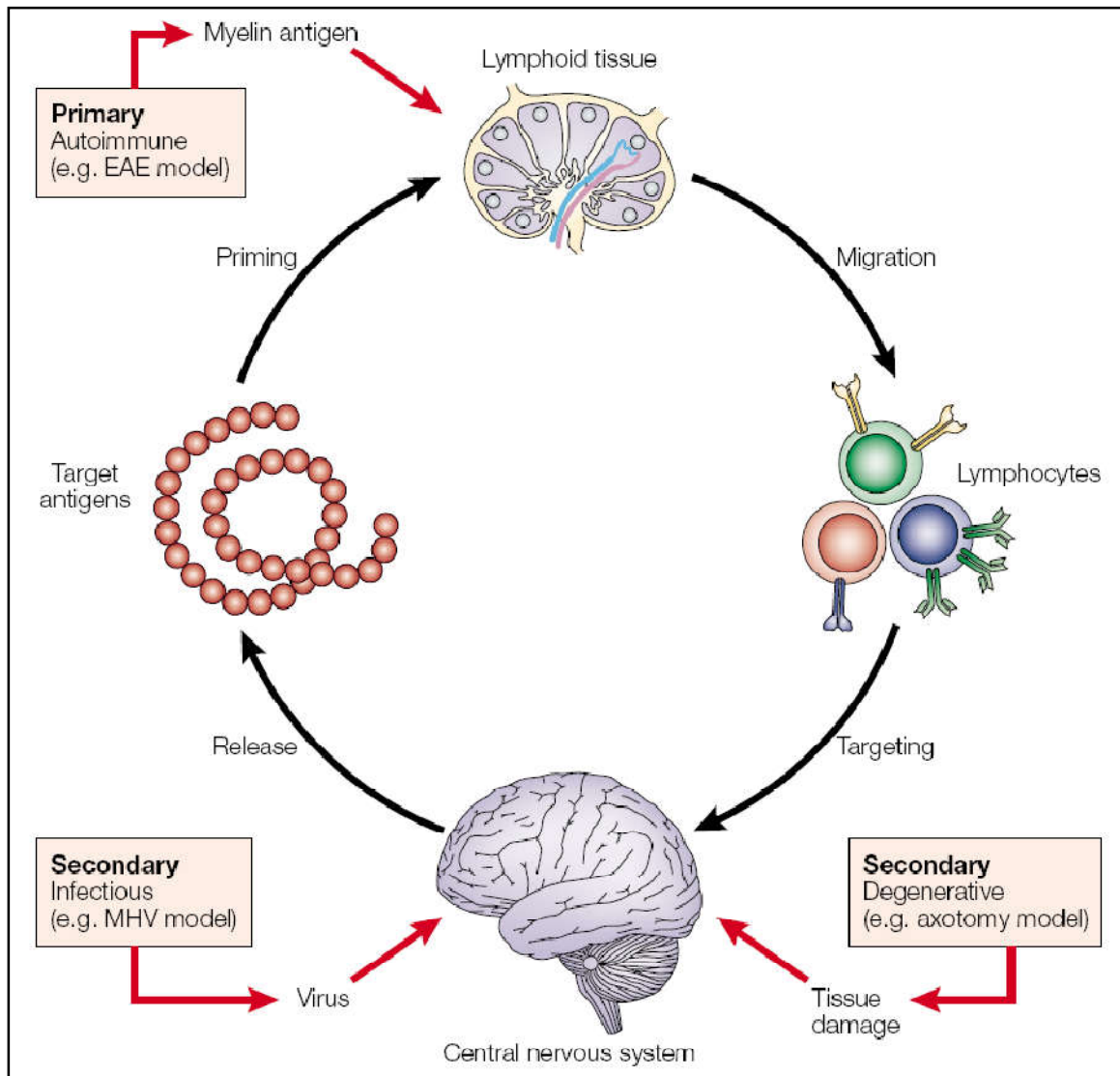


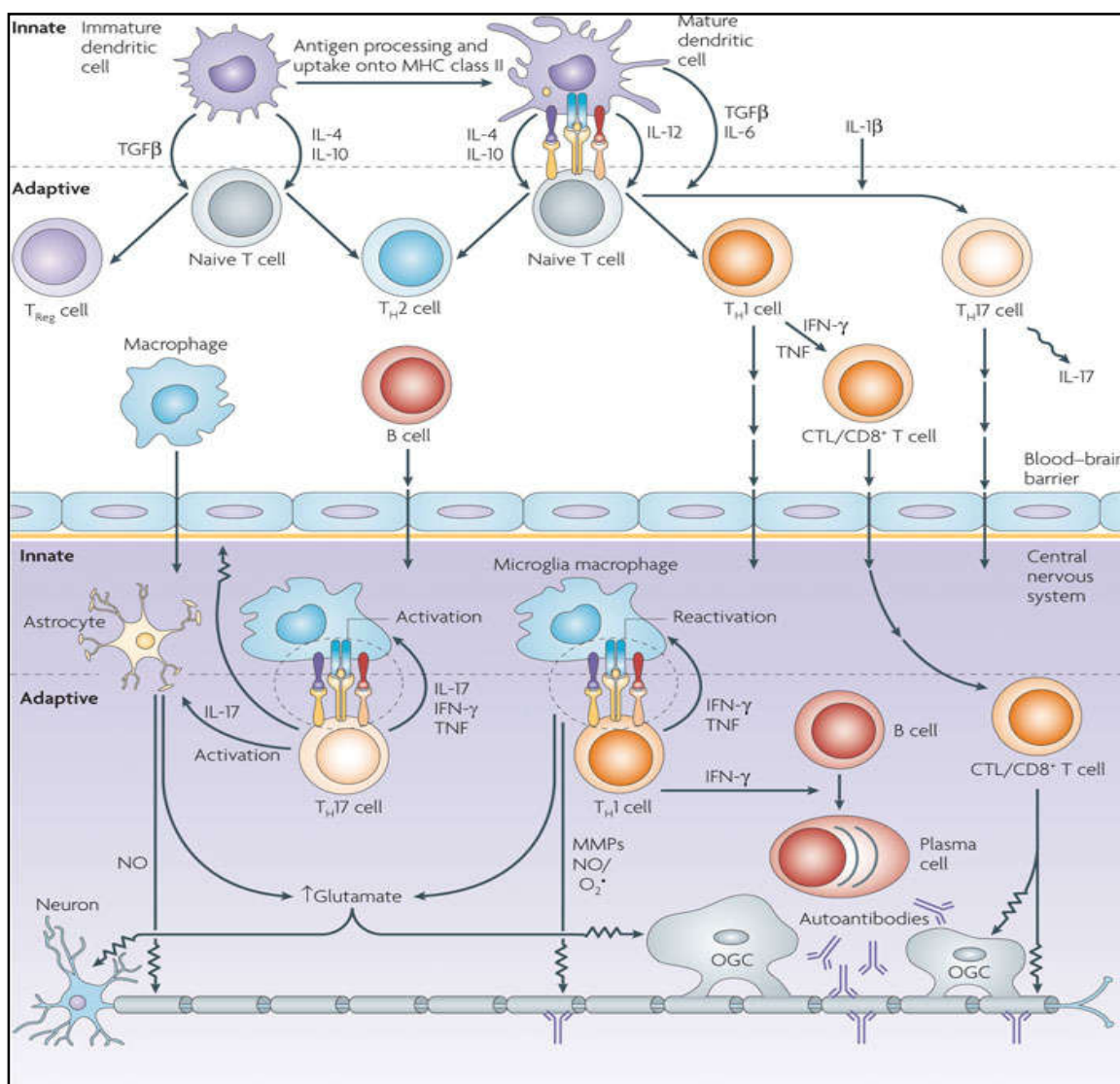
Figura 14: Posibles causas de neuroinflamación.

Se produce una primera liberación de antígenos neurales a la circulación periférica debido a un daño neural, bien por un traumatismo o un proceso inflamatorio previo. Estos antígenos son captados por células presentadoras de antígenos y presentados a los linfocitos B y T en los nódulos linfáticos. Aquellos que posean receptores de alta afinidad para estos antígenos se expanden y se liberan de los ganglios linfáticos distribuyéndose por la circulación sistémica y se acumulan donde reencuentran el mismo antígeno. Una vez reactivadas provocan una respuesta autoinmune frente a antígenos del SNC provocando neuroinflamación. Se especula que determinados antígenos virales que mimetizan antígenos neurales, pueden provocar igualmente esta respuesta inmune secundaria.

EAE: Encefalomielitis Autoinmune Experimental; MHV: Virus de la Hepatitis Murina. (Hemmer et al., 2002).

La mayor parte de los estudios sobre la patogenia de la EM se han realizado en el modelo animal Encefalomiелitis Aguda Experimental (EAE) en el que se realiza una sensibilización con antígenos del SNC tras el cual, las células dendríticas periféricas sufren una disregulación por la que se pierde parcialmente la inmunotolerancia. Esto conlleva a la liberación de una serie de citocinas que favorecen la proliferación clonal de linfocitos T autorreactivos en los nódulos linfáticos, desviando preferentemente su diferenciación hacia linfocitos Th1 CD4+ con capacidad de secreción de citocinas proinflamatorias que favorecen la proliferación de linfocitos, atracción de macrófagos y otros leucocitos, a la vez que promueven la activación de linfocitos B y células Th17 CD4+ (Figura I5).

Una vez en la circulación sistémica, los linfocitos Th1 y Th17 son reactivados por los macrófagos en los vasos de la leptomeninge adquiriendo la capacidad de expresar moléculas de adhesión como VL4 que se une a la VCAM endotelial, confiriéndole así capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) e invadir el SNC. Una vez allí comienza su expansión clonal y terminan su maduración al interactuar con células presentadoras de antígenos propios (Figura I5).



◀ **Figura I5 (página anterior): Fisiopatología en la EM.**

Las células dendríticas inmaduras están implicadas en el mantenimiento de la tolerancia periférica mediante la regulación de la respuesta de los linfocitos T. En los pacientes con EM se pueden encontrar células dendríticas activadas de forma errónea de forma que se pierde la inmunotolerancia. Esto provoca la expansión clonal de linfocitos T autorreactivos en los nódulos linfáticos. Su diferenciación hacia linfocitos CD4+ Th1, Th2, Th17 (colaboradores), linfocitos T reguladores o linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL o Tc) va a depender de la naturaleza del antígeno, de las señales coestimuladoras y de las citocinas circundantes. Posteriormente se liberan al torrente sanguíneo y son reactivadas por los macrófagos de los vasos leptomeníngeos, pudiendo entonces atravesar la BHE e invadir el SNC donde son reactivadas, se expanden clonalmente y finalmente se diferencian por los autoantígenos presentados por las células dendríticas. La presencia de células Th1, Th17, Tc y células plasmáticas autorreactivas en el SNC junto a microglía y astrocitos activados, inducen la producción de citocinas inflamatorias, especies reactivas de oxígeno, producción de anticuerpos y citotoxicidad implicada en la desmielinización y en el daño axonal, neuronal y de la BHE.

IFN: Interferón; IL: Interleucina; MHC class II: Complejo mayor de histocompatibilidad clase II; MMPs: Metaloproteasas de matriz; NO: óxido nítrico; TGF-β: Factor de crecimiento transformante β; TNF: factor de necrosis tumoral. (Brinkmann et al., 2010).

La inflamación comienza con la infiltración en el parénquima del SNC de linfocitos Th1 y Th17 CD4+ autorreactivos y células plasmáticas en el espacio perivascular. Posteriormente se activan astrocitos y microglía y se reclutan en la lesión macrófagos de la circulación sistémica. Días después se reclutan linfocitos T citotóxicos CD8+ (Tc). En conjunto se liberan grandes cantidades de citocinas inflamatorias, especies reactivas de oxígeno (ROS), autoanticuerpos y se produce citotoxicidad directa por algunos elementos celulares (Tabla I1) que están implicados en la pérdida de la BHE, desmielinización y daño axonal.

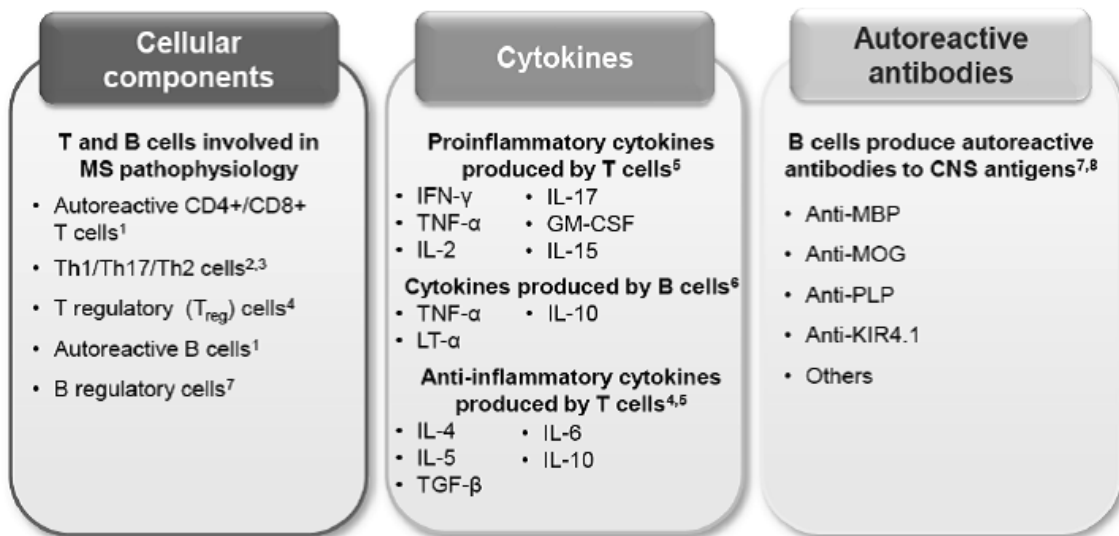
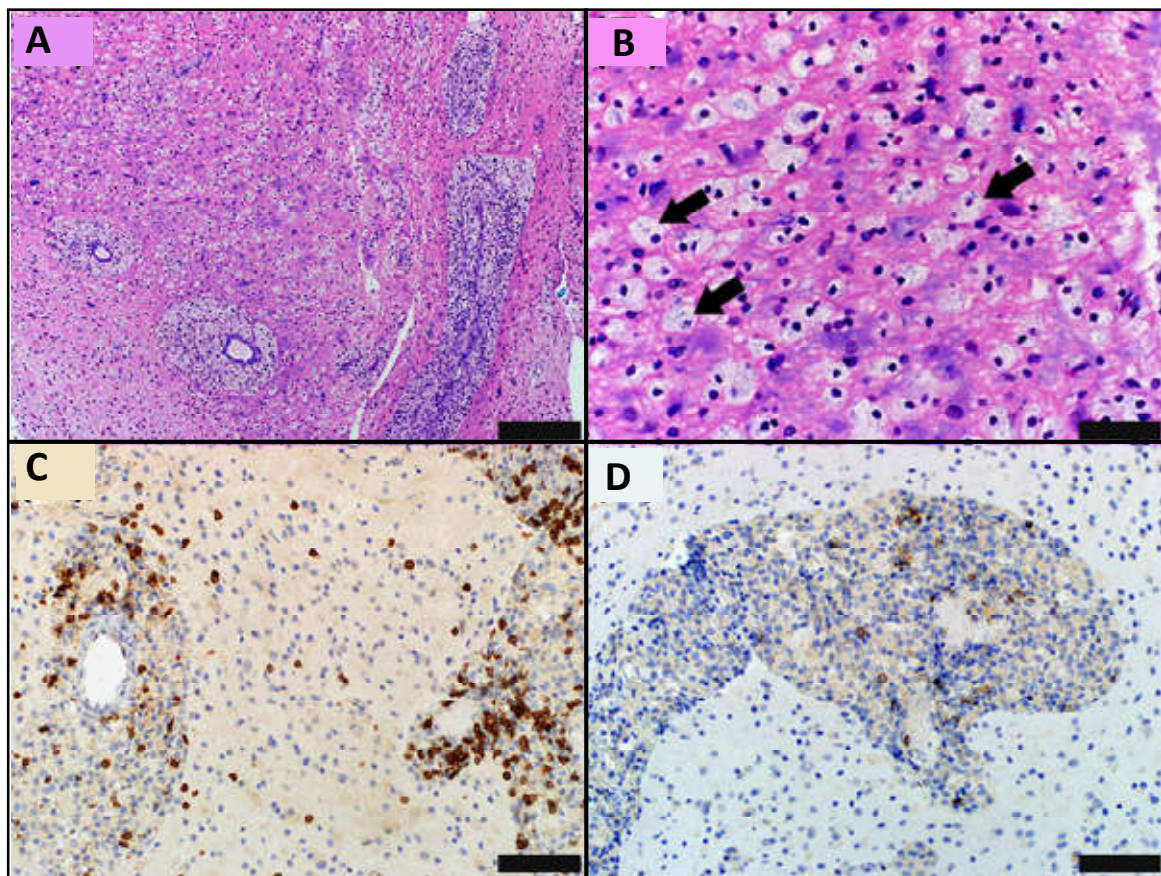


Tabla I1: Inmunopatogenia de la EM.

Sin embargo, mientras que en la EAE la inflamación se lleva a cabo por linfocitos Th CD4+, en la EM, independientemente de la etapa, predominan los linfocitos Tc CD8+ que se expanden clonalmente en la lesión. Además, en el curso de la maduración de la lesión se observan dos

oleadas de infiltrados linfocitarios. La más temprana ocurre cuando hay lesiones oligodendrocíticas iniciales con desmielinización y activación de microglía proinflamatoria junto a linfocitos Tc CD8+. Cuando los restos de mielina son eliminados por microglía y macrófagos, hay una segunda infiltración de linfocitos mayoritariamente CD8+ aunque también aparecen esporádicamente linfocitos Th CD4+ y células B, que mayormente están restringidas en los espacios perivasculares y meninges (Marik et al., 2007).

De este modo se forma un tejido inflamatorio y cicatricial perivascular en diferentes regiones de la sustancia blanca y sustancia gris del cerebro y médula espinal denominadas placas de desmielinización (Milo & Miller, 2014; Nylander & Hafler, 2012; Fletcher et al., 2010) formadas por infiltrados de linfocitos T, monocitos, macrófagos cargados de mielina fagocitada, linfocitos B y células plasmáticas. En ellas hay un incremento de astrocitos que forman la cicatriz glial y un menor número de oligodendrocitos con axones desmielinizados y/o dañados que han perdido el soporte trófico y metabólico que estas células les otorgaban (Nave, 2010a; Nave, 2010b). Igualmente, la pérdida de las vainas de mielina altera la correcta transmisión del impulso nervioso en los axones desmielinizados (Figura I6).



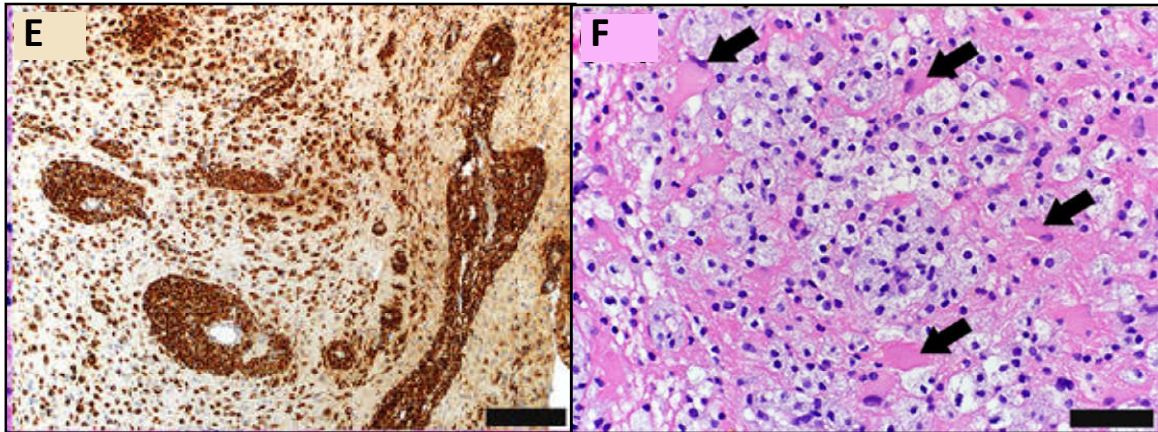


Figura 16 (junto a página anterior): Anatomía Patológica en EM.

(A): Lesión desmielinizada hipercelular infiltrada por macrófagos parenquimales y perivasculares. (B): Detalle de la imagen anterior mostrando restos de mielina (flechas) en el interior de macrófagos propios de una lesión desmielinizante activa. (C-E): Infiltración parenquimal y perivascular compuesta por linfocitos T CD8 (C), escasos linfocitos B CD20 (D) y gran acumulo de macrófagos y microglía activados CD68 (E). (F): Astrocitos reactivos (flechas).

A y B: Luxolfastblue/hematoxilina y eosina. F: hematoxilina/eosina. Escalas: 200 μ m en A y E; 50 μ m en B y F; 100 μ m en C y D (Popescu & Lucchinetti).

No está del todo claro si existe un daño axonal primario o ocurre como resultado de la pérdida de las vainas de mielina (Frischer et al., 2009), pues se ha observado neurodegeneración y pérdida axonal en zonas no afectadas por la desmielinización (DeLuca et al., 2006). Además, la afectación axonal y neuronal ocurre tempranamente en el curso de la EM (Casanova et al., 2003). Por contra, existen lesiones axonales en placas inactivas sugiriendo que la desmielinización crónica aumenta la vulnerabilidad de los axones y secundariamente la neurodegeneración prematura (Kornek et al., 2000).

3.5.2.- FASE PROGRESIVA.

Con la progresión de la enfermedad disminuye la severidad de la respuesta inflamatoria del tipo celular adaptativa y se hace más evidente la inflamación dependiente de la actividad del sistema inmune innato. Sin embargo, la desmielinización y la neurodegeneración no disminuyen en esta fase, por lo que las terapias antiinflamatorias no tienen efecto en esta fase de la enfermedad. Además, estas terapias son menos efectivas debido a la reparación de la BHE.

En esta fase son predominantes las lesiones inactivas y desaparecen los infiltrados de linfocitos T en el parénquima del SNC, quedando restringidos en las lesiones y en las meninges. La distribución de células B es igual a la fase aguda, aunque su número es diez veces menor (Frischer et al., 2009).

En aproximadamente la mitad de los pacientes con formas progresivas, se forman folículos linfoides ectópicos de células B en las meninges y en los espacios de Virchow-Robin que se

consideran órganos linfáticos terciarios. Se cree que la inflamación crónica crea un microambiente en estos compartimentos que favorece el reclutamiento y retención de células inflamatorias (Meinl et al., 2008), de modo que se forman centros germinales compuestos por agregados de linfocitos B CD20+ Ki67+, células reticulares CD35+, células estromales o foliculares dendríticas CXCL13+, células plasmáticas y linfocitos Tc CD8+ (Figura 17) capaces de producir citotoxicidad directa sobre el córtex lindante o a través de la activación de la microglía.

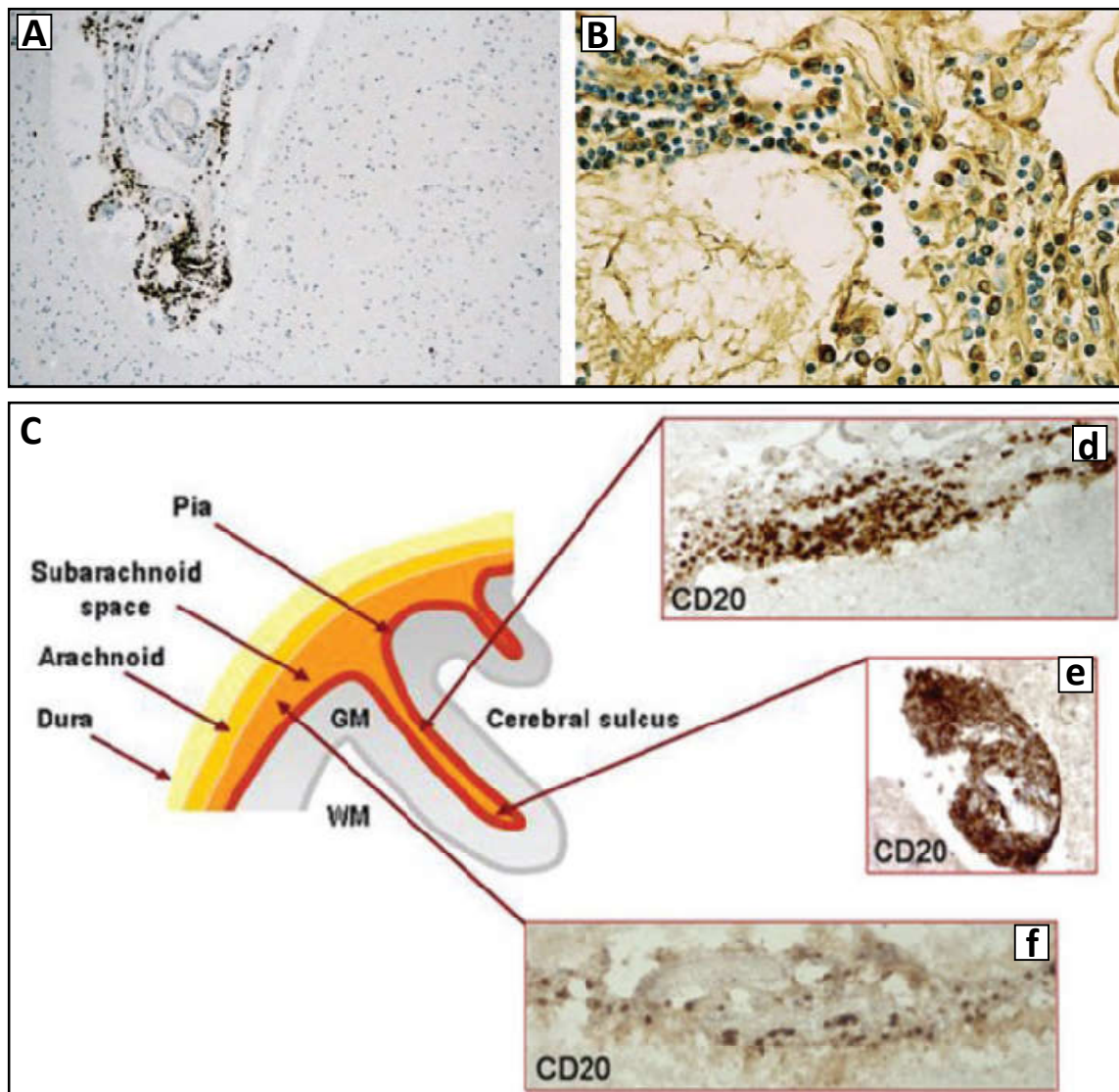


Figura 17: Folículos linfoides ectópicos en EM.

EM progresiva secundaria con inflamación intensa de meninges compuesta por linfocitos T CD8+ (A) y por células plasmáticas CD20+ marcadas frente a inmunoglobulinas (B). (C): Representación esquemática de la localización de los folículos ectópicos de linfocitos B a lo largo (d) y en el fondo (e) de los sulcus cerebrales, mientras que otros linfocitos B se distribuyen libres recubriendo la cara externa del cerebro en el espacio subaracnoideo (f).

A y B: (Lassmann et al., 2007); C: (Magliozzi et al., 2007).

La afectación del córtex ocurre en forma de gradiente, siendo mayor la desmielinización a nivel subpial con mayor afectación de las neuronas de las capas II, III y V (Magliozzi et al., 2010) que

pueden sufrir un proceso de degeneración Walleriana secundaria afectando a la sustancia blanca por donde discurren los haces de dichas motoneuronas (Frischer et al., 2009).

Por otro lado, estas lesiones carecen de infiltrados celulares inflamatorios, depósitos de inmunoglobulinas o productos del complemento activado, por lo que la desmielinización y afectación neuronal ocurre por un mecanismo no inmunomediado independiente al que afecta a la sustancia blanca (Bo et al., 2007). Estas formas se asocian a mayor agresividad en el inicio y curso de la enfermedad (Magliozzi et al., 2010).

3.5.3.- FISIOLÓGÍA AXONAL TRAS LA DESMIELINIZACIÓN.

La pérdida de mielina y por tanto de la conducción saltatoria del impulso nervioso, se ve compensada fisiológicamente por la inserción de canales de Na^+ dependientes de voltaje en las zonas desmielinizadas del axón (Figura 18A). De este modo, aunque se pierde la condición saltatoria, se consigue preservar la transmisión del impulso nervioso aunque a una menor velocidad (Aktas et al., 2010). Además, el diámetro axonal se ve incrementado secundariamente a la desmielinización crónica, disminuyendo así la resistencia interna al flujo de iones (Waxman, 2008a; Waxman, 2008b).

Sin embargo, el flujo persistente de Na^+ al interior del axón en todos los puntos carentes de mielina despolariza la membrana axonal de forma persistente, incrementando la concentración de Na^+ intracitoplasmático. De esta forma se altera el equilibrio iónico y se invierte el funcionamiento de la bomba intercambiadora de iones $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ para poder extraer el Na^+ sobrante del interior de la célula. Como consecuencia de la inversión del funcionamiento de la bomba, aumenta la concentración de Ca^{2+} en el interior del axón, que a través de un mecanismo dependiente de glutamato y de la actividad proteasa dependiente de Ca^{2+} , acaba provocando degeneración neuronal. Esta neurodegeneración es más patente en axones de pequeño calibre debido a que tienen una gran relación superficie/citoplasma y pocas mitocondrias para mantener el equilibrio iónico (Aktas et al., 2010).

Igualmente los cambios en la concentración de iones y la presencia de sustancias inflamatorias contribuyen a la aparición de metaloproteasas de matriz, citocinas, productos oxidativos y radicales libres que multiplican el daño y degeneración neural. Las pérdidas neuronales provoca déficits neurológicos irreversibles y un aumento de la atrofia cerebral más patente en la fase progresiva de la enfermedad (Figura 18B) (Aktas et al., 2010).

3.5.4.- DAÑO OXIDATIVO.

En la patogénesis de la EM existe un déficit energético de forma temprana debido a lesiones mitocondriales donde se afecta la citocromo C oxidasa y su respectivo complejo IV de la cadena

de transporte electrónico. Sin embargo, en la fase crónica aumenta el número y actividad mitocondrial debido al incremento de la demanda energética de los axones desmielinizados (Lassmann, 2011).

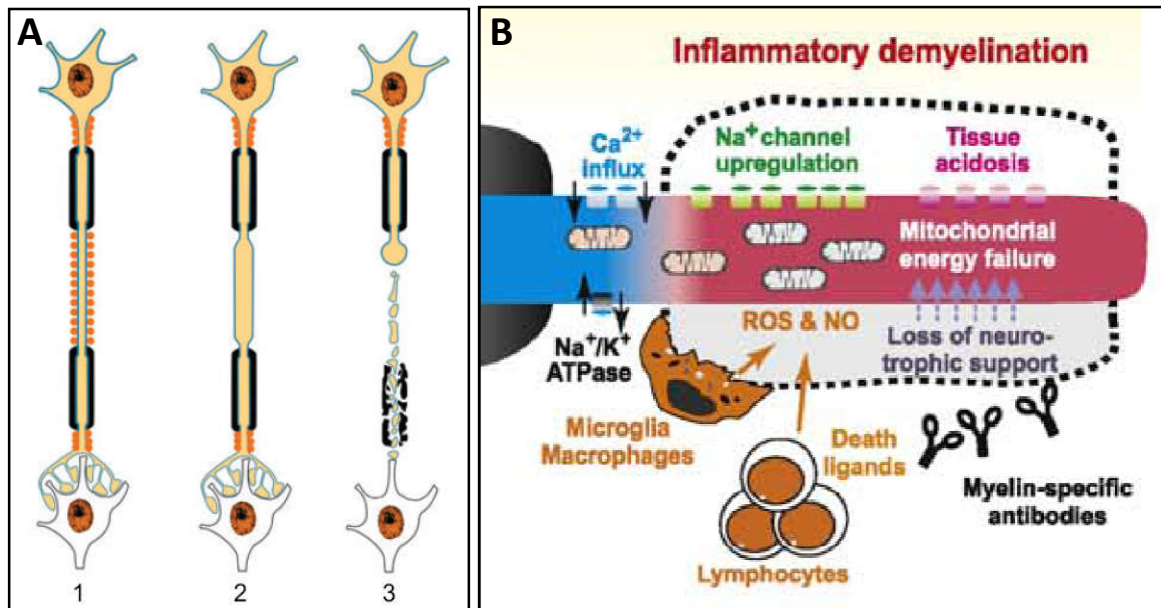


Figura I8: Disfunción y destrucción neuronal tras la desmielinización.

(A): La degeneración de los axones desmielinizados crónicamente provoca atrofia cerebral y secuelas neurológicas irreversibles. **1:** los axones desmielinizados preservan su funcionalidad redistribuyendo canales de Na^+ en el axolema desmielinizado (puntos rojos). **2:** La pérdida del soporte trófico que proporcionan los oligodendrocitos provoca desorganización del citoesqueleto del axón y edema. **3:** Finalmente los axones degeneran junto a los oligodendrocitos de los que depende (Trapp & Nave, 2008).

(B): Durante el transcurso de una desmielinización inflamatoria, la mielina puede verse afectada por especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO), acidosis tisular, anticuerpos específicos frente antígenos de mielina y ligandos apoptóticos. En consecuencia, los oligodendrocitos y el propio axón pueden verse dañados. La alteración iónica del axón produce un incremento del flujo de Ca^{2+} que activa a proteasas dependientes de Ca^{2+} como la calpaina. El flujo continuado de Na^+ acaba limitando la transmisión del impulso nervioso. Todo esto conlleva a un fracaso mitocondrial que no es capaz de mantener los requerimientos energéticos de esta nueva situación (Aktas et al., 2010).

En las células progenitoras de oligodendrocitos, el daño mitocondrial inhibe la diferenciación a oligodendrocitos maduros y la pérdida de procesos citoplasmáticos, inhibiendo por tanto los mecanismos remielinizantes del tejido dañado (Ziabreva et al., 2010); en las neuronas, el daño mitocondrial provoca un fallo en la conducción del impulso nervioso y en última instancia neurodegeneración (Campbell et al., 2011).

El fallo energético libera el citocromo C mitocondrial induciendo la apoptosis oligodendroglial y liberando especies reactivas de oxígeno al medio extracelular que junto al óxido nítrico (NO), alteran la permeabilidad de otras mitocondrias liberando más factores proapoptóticos (Lassmann, 2011).

La mielina, los oligodendrocitos y las neuronas son las estructuras que más epítomos oxidados de DNA y fosfolípidos de mielina acumulan en las lesiones agudas y crónicas. En astrocitos y macrófagos, los restos oxidados aparecen en el interior de vacuolas de auto/heterofagocitosis respectivamente (Haider et al., 2011).

Por otro lado, tras la apoptosis del oligodendrocito se libera la carga de ferritina almacenada por lo que el hierro se acumula en la lesión, en los macrófagos y en la microglía. En estas condiciones el ion férrico se oxida con peróxido de hidrógeno generando ión ferroso y radicales hidroxilos muy reactivos, amplificando de este modo el daño oxidativo. Este proceso ocurre en todas las fases de la EM pero es mayor cuanto más carga de ferritina tiene los oligodendrocitos que coincide con el inicio de la fase progresiva de la enfermedad (Lassmann, 2011).

3.6.- FACTORES DESENCADENANTES.

Hay diversos factores que se plantean como desencadenantes del inicio o de los brotes de la enfermedad (Goodin, 2016):

- Infecciones virales que desencadenarían nuevos brotes por medio de la sobreexpresión de interferón gamma (IFN- γ) y TNF (De Chiara et al., 2012; Fierz, 2017; Mentis et al., 2017).
- La gestación es un factor protector de la aparición de brotes, pero en el puerperio se incrementa su aparición por el estrés o por los cambios hormonales que inducirían alteraciones inmunológicas (Gold & Voskuhl, 2016).
- Las vacunaciones se han asociado tanto al inicio de la enfermedad como a los brotes pues activan el sistema inmunitario y por tanto, están contraindicadas (Mailand & Frederiksen, 2017).
- Otros factores que también se creen pueden estar implicados son los traumatismos craneoencefálicos, estrés emocional, cansancio y calor (Gupta & Sen 2016; Wang et al., 2014).

3.7.- DIAGNÓSTICO.

Para diagnosticar a un paciente con EM se debe (Olek, 2017):

- Descartar otras patologías que produzcan una clínica similar como lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Sjögren, émbolos sépticos o neoplasias.
- Debe ser una patología recurrente, bien por la aparición de un nuevo brote, o por la localización de nuevas lesiones en técnicas de imagen.
- Carácter crónico de la enfermedad.

- Cumplir una serie de criterios, como son el origen inflamatorio desmielinizante de la enfermedad a través del estudio de signos y síntomas sugestivos, del estudio del líquido cefalorraquídeo y de técnicas de imagen.

3.7.1.- CLÍNICA.

A) Los síntomas de inicio más frecuentes son (Olek, 2017):

- Alteración de la sensibilidad (45%) consistente en la aparición de parestesias de miembros o tronco, hipoestesia táctil, térmica y dolorosa, disminución de la sensibilidad profunda y posicional.
- Alteraciones motoras (40%) caracterizada por paresias e hiperreflexia osteotendinosa con aumento del área reflexógena. También puede aparecer clónus aquileo.
- Disfunciones del tronco encefálico (25%) como disartria, diplopía, disfagia, vértigo, nistagmo horizontal, vertical, rotatorio y oftalmoplegia internuclear.
- Alteraciones visuales (20%) con escotoma central y disminución de la agudeza visual.
- Afectación cerebelosa (20%) en forma de disartria, incoordinación motora, inestabilidad en la marcha, temblor intencional y disdiadococinesia.

B) Durante el curso de la enfermedad son predominantes las alteraciones motoras (90%), sensitivas (80%), cerebelosas (75%), del tronco encefálico, esfinterianas, mentales y visuales. Además, también es frecuente la aparición de fatiga que se exagera con el calor (75%), atrofia muscular, dolor (50%), signo de Lhermitte (40%), trastornos cognitivos, trastornos afectivos como la depresión (75%), alteraciones esfinterianas (90%) y alteraciones sexuales (70%).

3.7.2.- TÉCNICAS DE IMAGEN

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es fundamental para el diagnóstico (Olek, 2017) ya que permite localizar lesiones incluso antes de que aparezca la clínica. Además, permite determinar las características de la inflamación. Es típico la presencia de múltiples lesiones ovaladas de unos 6 mm periféricas al cuerpo caloso, en la sustancia blanca yuxtacortical, periventricular, en tronco del encéfalo y médula espinal. Son lesiones inflamatorias cuando son hiperintensas en secuencia T2 y flair. Si captan gadolinio en T1 se trata de una lesión aguda e inflamada debido al aumento de la permeabilidad de la BHE al contraste (Figura I9).

3.7.3.- LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO.

El líquido Cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes con EM es transparente, incoloro y de presión normal (Olek, 2017). El número de células es normal con predominio de linfocitos T. La concentración de proteínas y albúmina se encuentra en rango normal en un 40% de los casos o ligeramente aumentadas en un 30%.

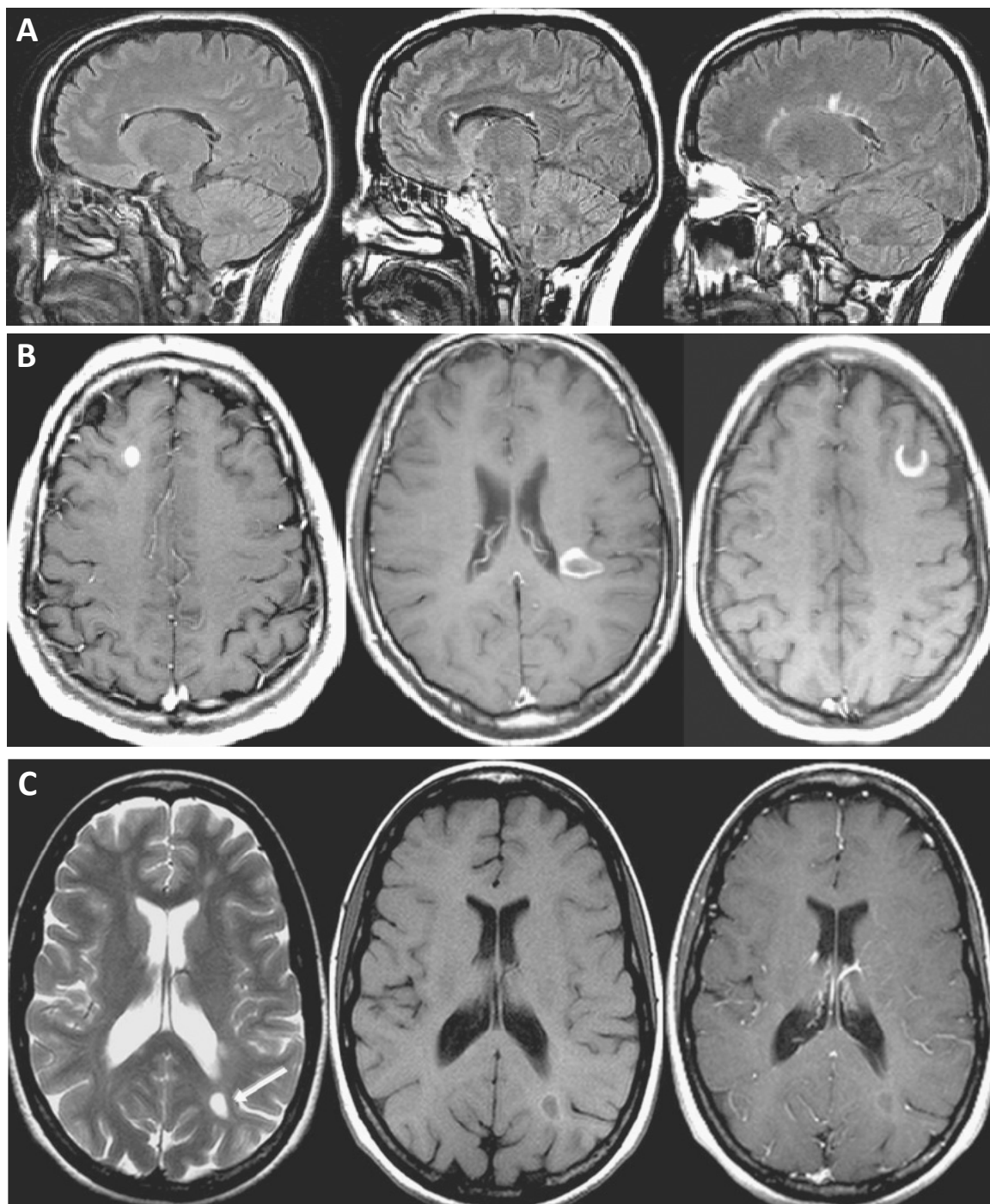


Figura 19: Imágenes de Resonancia Magnética en EM.

(A): Imágenes sagitales en secuencia Flair en un paciente con EM donde se observan lesiones focales hiperintensas periventriculares y en el área subependimaria del cuerpo calloso.

(B): Imágenes transversales en secuencia T1 con Gadolinio en tres pacientes diferentes mostrando lesiones con realce nodular (izquierda), anular (centro) y anillo incompleto (derecha) característico de las lesiones desmielinizantes con inflamación activa.

(C): Imágenes transversales en secuencia T2 (izquierda), T1 (centro) y T1 con Gadolinio (derecha) en un paciente con EM secundaria progresiva donde se muestra una lesión desmielinizada hipercaptante en T2 y que muestra un anillo periférico en T1 que no realza tras la administración de contraste característico de las lesiones crónicas de la EM (Rovira et al., 2010).

Sin embargo en el 70% de los casos es característica la elevación de las inmunoglobulinas (Ig) sobre todo de IgG, respecto al resto de proteínas. Esto se ve representado por la presencia de bandas oligoclonales en los análisis electroforéticos del LCR no presentes en el suero en el 90% de los pacientes.

Estas Ig están producidas por uno o más clones de células plasmáticas y es indicativo de una producción intratecal de las mismas. La detección de IgM en el LCR es indicativo de una peor progresión

3.7.4.- CRITERIOS DE MCDONALD (2010).

Según los criterios de McDonald modificados, para diagnosticar una EM hay que demostrar una diseminación de las lesiones en el espacio y en el tiempo (Olek, 2017).

- La diseminación en el espacio se demuestra cuando se detecta una lesión en RMN en al menos dos de las siguientes localizaciones: área periventricular, tronco del encéfalo, yuxtacortical y/o médula espinal, sin que ninguna de ellas explique la sintomatología.

- La diseminación en el tiempo se determina mediante la localización en RMN de lesiones en diferentes estadios evolutivos según su capacidad de captar o no contraste.

3.7.5.- OTROS.

- POTENCIALES EVOCADOS (PE). La desmielinización provoca unos PE de latencia retardada y morfología conservada. Son útiles para la valoración de la integridad de las vías nerviosas sensitivas o motoras en presencia de lesiones en RMN que no han producido clínica. Los PE de la vía visual son muy sensibles para establecer el diagnóstico de EM, mientras que los PE de la vía motora únicamente son útiles para la valoración de la vía piramidal y solo deben ser valorados en el contexto clínico.

- ESCALA EXPANDIDA DEL ESTADO DE DISCAPACIDAD (EDSS). Desarrollada por Kurtzke en 1955 es un método que cuantifica la discapacidad en EM en 8 sistemas funcionales (piramidal, cerebeloso, tronco cerebral, sensorial, intestino/vejiga, visual, cerebral y otros). Los resultados de la valoración oscilan entre 0.0 (examen neurológico normal) a 10 (muerte por EM), siendo 5 limitación para la deambulacion. Mediante esta escala se puede evaluar la progresión de la discapacidad de la enfermedad de forma objetiva entre la gran variedad de síntomas dispares asociados que caracterizan la EM (Kurtzke, 1983) (Figura I10).

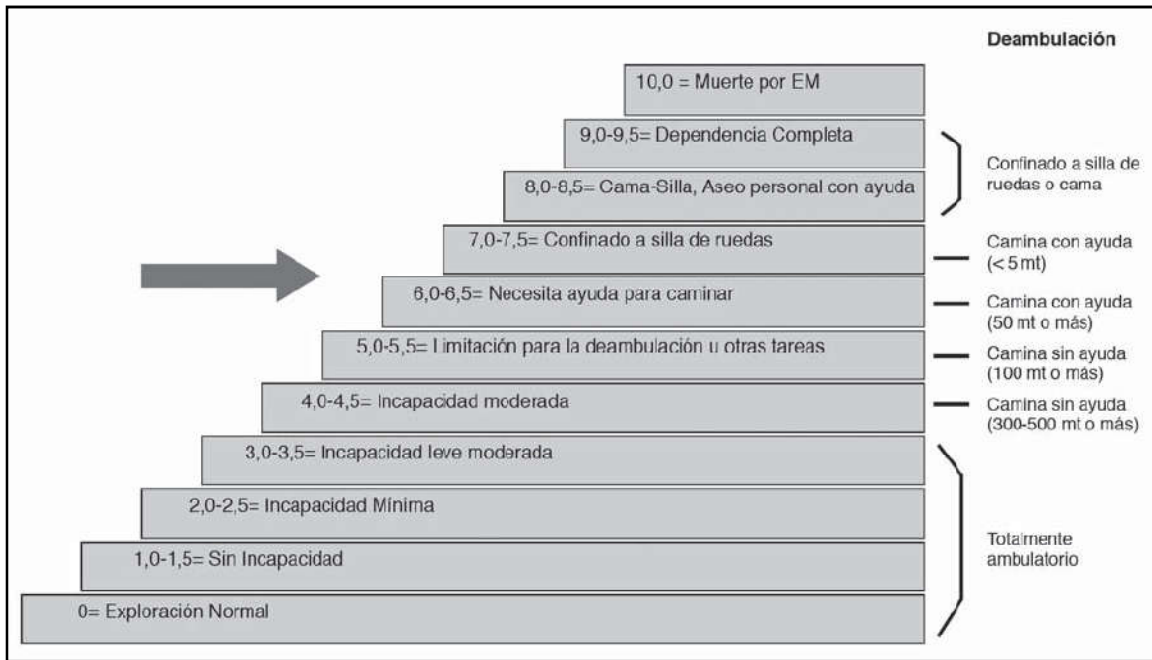


Figura I10: Escala de discapacidad EDSS de Kurtzke (Kurtzke, 1983).

3.8.- TRATAMIENTO.

Los tratamientos actuales pretenden reducir la progresión de la enfermedad y preservar la función neurológica, actuando tanto sobre los mecanismos inflamatorios del brote agudo como en los mecanismos patogénicos propios de la enfermedad. Sin embargo, las formas progresivas carecen de tratamiento específico, limitándose éste al tratamiento de los síntomas (Wingerchuk & Carter, 2014).

3.8.1.- TRATAMIENTO DEL BROTE.

- **6-Metilprednisona.** Tiene efecto inmunomodulador y antiinflamatorio restaurando la integridad de la BHE y reduciendo el edema. Acorta la gravedad y la duración de los brotes al tiempo que acelera la recuperación. Se administra 1gr vía oral o intravenosa durante 5 días con protección gástrica. Si no remiten los síntomas se puede repetir el ciclo de tratamiento (Goodin, 2014).

- **Plasmaféresis.** Si tras el tratamiento con corticoides no se obtiene respuesta, se realiza un recambio plasmático durante 5 sesiones en días alternos. En este tratamiento se separa el plasma de los componentes celulares mediante centrifugación. El plasma extraído junto a las inmunoglobulinas se reemplaza por una disolución de albúmina, devolviendo la sangre reconstituida al paciente (Muhlhausen et al., 2015).

- **Ciclofosfamida.** Es un inmunosupresor utilizado en brotes severos que no responden a los tratamientos anteriores (Okuda, 2014).

3.8.2.- TRATAMIENTOS MODIFICADORES DE LA ENFERMEDAD.

El objetivo de estos tratamientos es prevenir los brotes y atenuar la progresión de la discapacidad (Figura I11).

A) FARMACOS DE PRIMERA LÍNEA. Todos ellos tienen una eficacia del 50-60% en la prevención de los brotes. Cuando pese al tratamiento aparece un brote sin cambios en RMN, no es indicativo de cambio de medicamento, pero sí de su forma de presentación.

- **Interferón- β .** Los interferones son citocinas producidas por células del sistema inmunitario en respuesta a infecciones virales y de bacterias intracelulares. Tienen propiedades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras aumentando la función supresora de linfocitos Tc CD8+. Así mismo también reduce la secreción de IFN- γ y FNT disminuyendo los efectos proinflamatorios de estas citocinas. Además aumenta la secreción de IL10 y factor de crecimiento de fibroblastos- β , que tienen efectos antiinflamatorios. Reduce la frecuencia de aparición de brotes un 30% al tiempo que disminuye la severidad de los mismos y frena la progresión de la enfermedad. Actualmente se dispone de una forma pegilada que permite su administración subcutánea cada 14 días. Entre sus efectos adversos destacan síntomas gripales, reacciones locales en el punto de inyección, disfunción hepática, y anormalidades tiroideas y menstruales (Praksova et al., 2012).

- **Acetato de Glatiramero.** Es un copolímero sintético formado por alanina, glutamina, lisina y tirosina, que tiene similitudes inmunológicas con la MBP. Actúa como inmunomodulador al bloquear la presentación de antígenos de mielina a los linfocitos T. Sus efectos clínicos son similares al interferón- β . Se administra subcutáneo cada 24h. Entre los efectos adversos destaca dolor torácico, disnea y linfadenopatías (Arnold et al., 2013).

- **Teriflunamida.** Inmunosupresor selectivo que provoca linfopenia mediante la inhibición de la síntesis de pirimidinas reduciendo la activación y proliferación de linfocitos T y B. Disminuye el número de brotes, la actividad inflamatoria y atenúa la progresión de la discapacidad durante más de 7 años. Entre sus efectos adversos destaca linfopenia, alteraciones gastrointestinales, pelo fino y malformaciones fetales. Se deben controlar los niveles de transaminasas cada 15 días durante 6 meses. Se administra vía oral cada 24h (Confavreux et al., 2012).

- **Dimetilfumarato.** Inmunosupresor que provoca linfopenia. No suele utilizarse porque su eficacia es similar al acetato de glatiramero y ligeramente superior a la teriflunamida, pero incrementa el riesgo de aparición de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) por virus JC.

Es frecuente la aparición de rubor facial. Se administra vía oral cada 12h con escalado de dosis durante una semana (Kasarello et al., 2017).

B) FÁRMACOS DE SEGUNDA LÍNEA. Más eficaces pero con mayores efectos secundarios. Se utilizan cuando el paciente presenta un brote con cambios en RMN pese a seguir una pauta correcta con alguno de los tratamientos de primera línea.

- **Fingolimod.** Modulador selectivo que bloquea los receptores esfingosina-1-fosfato de los linfocitos, secuestrándolos en los órganos linfáticos e impidiendo su salida a la circulación general. Por ello es el fármaco que más linfopenia e inmunosupresión produce. Además puede atravesar la BHE y experimentalmente también favorece la homeostasis de los progenitores de oligodendrocitos por lo que tiene propiedades neurorreparadoras (Aktas et al., 2010). Se debe controlar la función hepática y la posible aparición de edema macular. Se debe retirar el tratamiento si los linfocitos disminuyen por debajo de 200 cels/ml. Se administra vía oral cada 24h.

- **Natalizumab.** Es el fármaco más potente actualmente reduciendo la tasa de brotes un 60% al tiempo que incrementa el volumen del tejido nervioso. Bloquea el receptor VCAM de los linfocitos evitando que atraviesen la barrera hematoencefálica y pasen al SNC. Su uso está limitado a fármaco de segunda línea por el riesgo de desarrollar LMP. Se administra vía intravenosa cada 30 días (Zivadinnov et al., 2012).

C) FÁRMACOS DE TERCERA LÍNEA. Son medicaciones de rescate.

- **Ciclofosfamida.** Es un agente citostático alquilante del DNA que impide la replicación celular y en consecuencia activa la apoptosis de células en estado replicativo. Se utiliza como un potente fármaco inmunosupresor (Okuda, 2014).

- **Mitoxantrona.** Su uso se restringe a las formas EM-PP y EM-SP, aunque su efectividad no es del todo clara. Bloquea la síntesis del DNA aumentando la maduración de los linfocitos NK. Es un fármaco cardiotóxico (Chanvillard et al., 2012).

- **Rituximab.** Anticuerpo monoclonal que se une a los receptores CD20 de los linfocitos B interrumpiendo totalmente la producción de anticuerpos. Se está estudiando su uso en formas progresivas con formación de folículos linfoides B en meninges. Para neutralizar los anticuerpos circulantes sintetizados por las células plasmáticas, se pueden utilizar inmunoglobulinas intravenosas (Bittner et al., 2017).

- **Alentuzumab.** Anticuerpo monoclonal Anti-CD52 que provoca una linfopenia T de la circulación sistémica muy marcada durante 6 meses. Entre sus reacciones adversas destacan reacciones a

la infusión, infecciones, alteraciones autoinmunes, problemas tiroideos, púrpura y síndrome de Goodpasture, por lo que se deben realizar analíticas mensuales. Se administra vía intravenosa durante 5+3 días con intervalos de 12 meses entre ambos (Kasarello et al., 2017).

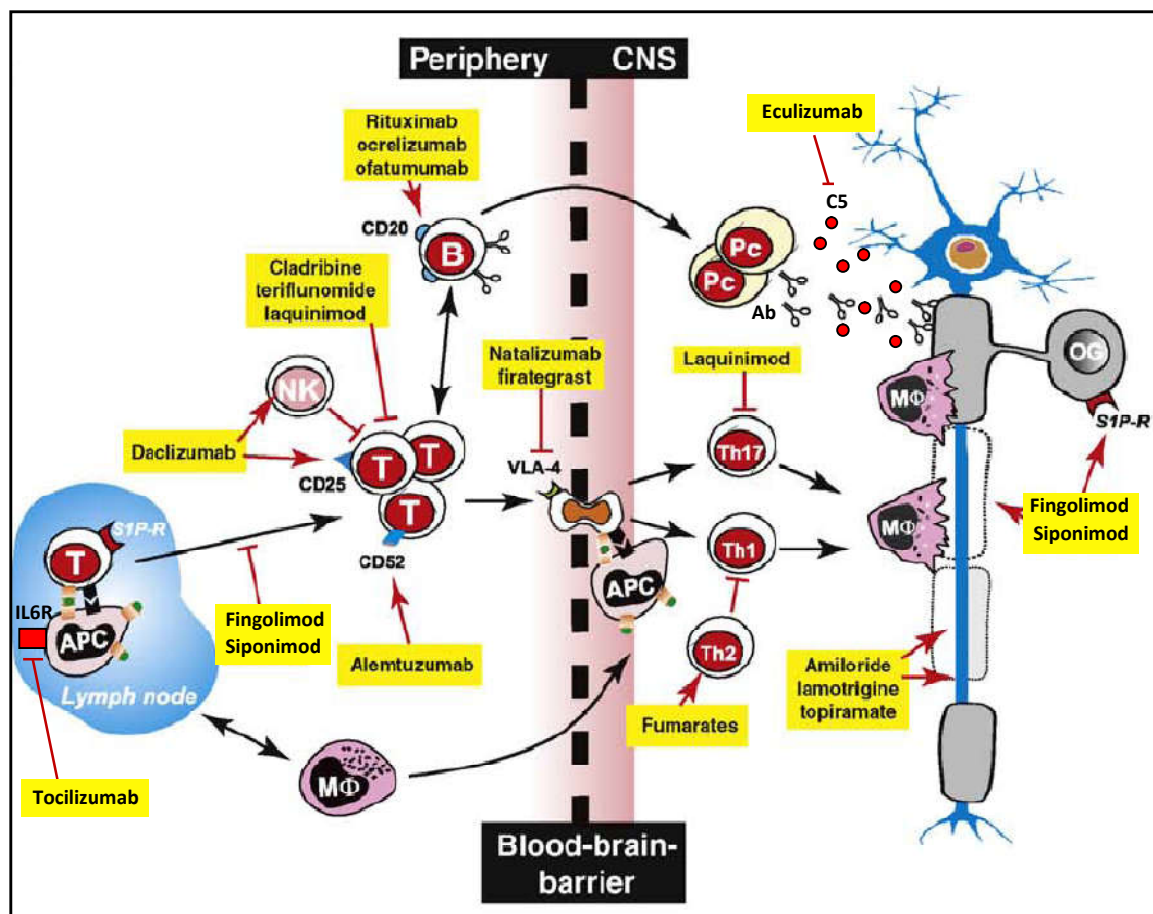


Figura I11: Enfoques terapéuticos en Inmunomodulación.

Los nuevos fármacos utilizados en EM tienen modos de acción heterogéneos. Incluye interacciones con varios equivalentes moleculares y celulares dentro del sistema inmune y sistema nervioso. Las líneas rojas con forma de T indican bloqueo de estructuras o rutas dianas. Las flechas rojas indican posibles interacciones terapéuticas.

Ab: anticuerpos; APC: célula presentadora de antígeno; C5: factor de complemento 5; IL6R: receptor de la Interleucina 6; MΦ: Macrófago; OG: oligodendrocito; Pc: célula plasmática; S1p-r: receptor de la esfingosina 1 fosfato; Th: célula T colaboradora; VLA-4: Integrina very late antigen-4 (Aktas et al., 2010).

3.8.3.- TRATAMIENTOS SINTOMÁTICOS (Prieto, 2014).

- Fatiga Crónica: Aparece en el 70-80% de los pacientes independientemente del estadio de la enfermedad. Se trata con Fampridina que es un bloqueante de los canales de potasio.
- Espasticidad: Se puede tratar con rehabilitación y miorrelajantes musculares como el baclofeno o tizanida.
- Disestesias: Se trata con fármacos anticonvulsivos como la Carbamazepina.

- Síndrome de Lhermitte: Es un síntoma pasajero y repetitivo caracterizado por una sensación de descarga eléctrica que recorre toda la columna vertebral y que puede estar asociado a parestesias de brazos y /o piernas. Aparece al inclinar pasiva o activamente el cuello hacia delante. Aparece en el 30-40% de los pacientes cuando hay lesiones de los cordones posteriores a nivel cervical. Se trata con Carbamacepina.
- Alteraciones Cognitivas: Aparecen en el 60% de los pacientes. Se trata con estimulación cognitiva.
- Disfunción Urinaria: Afecta a un 70% de los pacientes. Se trata con toxina botulínica, fármacos específicos y neuroestimuladores.
- Disfunción sexual: Aparece tanto en hombres como en mujeres, y su tratamiento se aborda de forma distinta en función del sexo.
- Disfagia: Derivación de la comida directamente al estómago para evitar neumonías por aspiración.

4.- REMIELINIZACIÓN EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

Tras un proceso desmielinizante, el número de oligodendrocitos en la lesión es mayor que los que había inmediatamente tras producirse el daño. Esto sugiere que existe un proceso por el cual se generan nuevos oligodendrocitos con capacidad de remielinizar axones (Franklin, 2002).

La remielinización es el fenómeno por el que se generan nuevas vainas de mielina alrededor de los axones desmielinizados. Es un proceso fisiológico que ocurre en muchas de las lesiones de la EM-RR, pero es incompleta e inadecuada, pues las nuevas vainas de mielina son más finas y más cortas que las originarias. Además, en las placas de desmielinización crónica únicamente puede observarse remielinización en las zonas periféricas de la lesión (Figura I12).

Conocer los procesos de atracción y diferenciación de las células precursoras de oligodendrocitos (CPO) a oligodendrocitos, los mecanismos involucrados en su interacción con axones desmielinizados y la formación de vainas de mielina funcionales son procesos claves a conseguir en las futuras terapias remielinizantes en EM, cuyo fin es atenuar la degeneración neuronal, ya que los axones desmielinizados son más susceptibles de sufrir daños (Figura I12A).

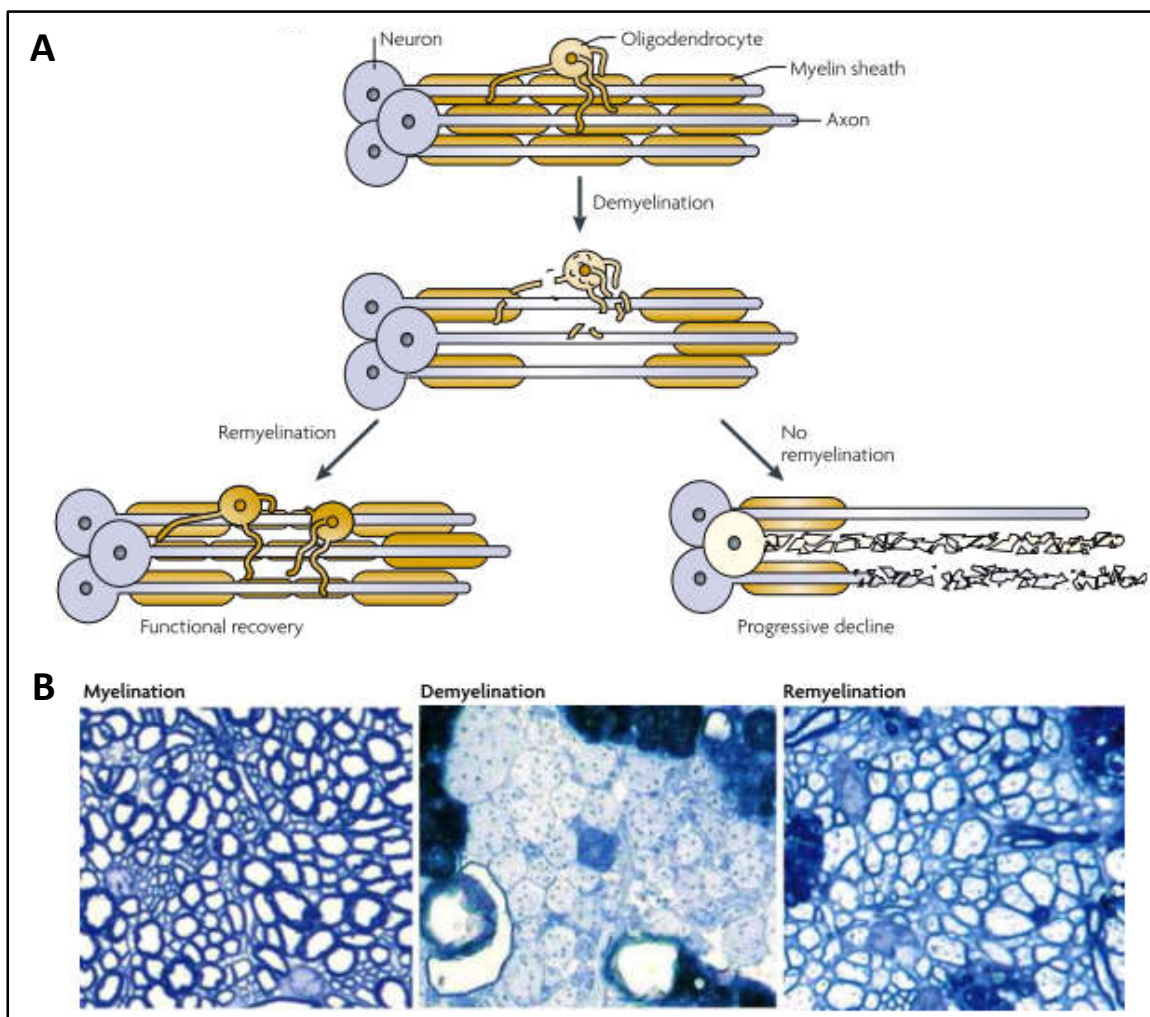


Figura 112: Evolución de los axones desmielinizados.

(A): Después de una lesión desmielinizante, los axones se pueden volver a remielinizar gracias a la actividad de nuevos oligodendrocitos y aunque esta mielina es más fina y corta que la generada durante el desarrollo embrionario, permite cierto grado de recuperación funcional y protección axonal. Sin embargo, en muchas lesiones de EM no ocurre remielinización dejando a los axones desprotegidos frente a la degeneración condicionando déficits funcionales irreversibles.

(B): Secciones transversales de 1 μ m de grosor de la sustancia blanca teñidas con azul de toluidina mostrando una mielinización normal de axones de varios diámetros (izquierda); axones desmielinizados con macrófagos llenos de restos miélinicos (centro); axones remielinizados con vainas de mielina más finas cuatro semanas después de interrumpir el estímulo lesivo (derecha) (Franklin & French-Constant, 2008).

4.1.- NICHOS NEUROGÉNICOS EN EL SNC ADULTO.

4.1.1.- ZONA SUBVENTRICULAR.

La Zona Subventricular (SVZ) se encuentra en las paredes de los ventrículos laterales y es el principal nicho neurogénico del SNC adulto. Está compuesto por células progenitoras (tipo B) con escasa capacidad proliferativa. Estas células provienen de la glía radial embrionaria y tienen características astrocitarias (Noctor et al. 2004; Platel et al., 2009). Están separadas del

ventrículo por una monocapa de células ciliadas endimarias (tipo E). Las células B dan lugar a una población celular con elevada capacidad de proliferación y que se consideran células de amplificación (tipo C) que generan neuroblastos inmaduros (tipo A) con capacidad de formar largas cadenas migratorias independientes de la guía axonal o de la glía radial, denominada camino migratorio rostral. Estas cadenas migratorias están rodeadas por células tipo B y generan interneuronas en el bulbo olfatorio (Doetsch & Alvarez-Buylla, 1996; Lois et al., 1996; Lois & Alvarez-Buylla, 1994) (Figura I13). Además, la SVZ está formada por una densa red de capilares vasculares y una matriz extracelular que contacta con todos estos tipos celulares.

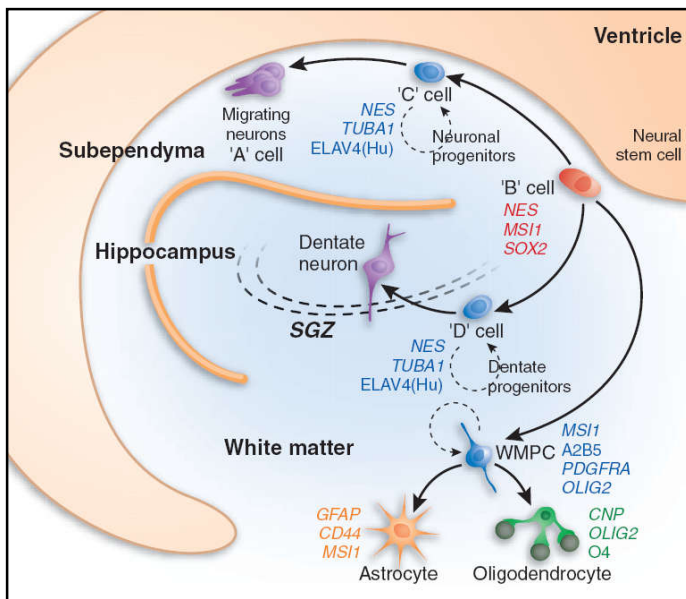


Figura I13: Células madre y células progenitoras en el cerebro humano adulto.

Se muestran las relaciones existentes entre las diferentes categorías de células progenitoras, sus marcadores y las células con capacidad de aumentar la población celular de la línea en cuestión.

Las células madre neurales periventriculares (rojo) generan tres poblaciones celulares transitorias de amplificación de la línea neural y glial (azul). Esto incluye progenitores neurales del subependimo ventricular, de la zona subgranular del giro dentado y las células progenitoras gliales de la sustancia blanca subcortical (WMPC). Estas células transitorias dan lugar a células diferenciadas según su localización, incluyendo neuronas (morado), oligodendrocitos (verde) y astrocitos parenquimales (naranja) (Goldman & Sim, 2005).

Sin embargo, cuando existe una lesión desmielinizante cercana en el camino migratorio rostral, las células tipo A pueden reprogramarse generando células gliales (Cayre et al., 2006) y algunas células tipo B son capaces de proporcionar CPO con capacidad de diferenciarse a oligodendrocitos maduros (Menn et al., 2006).

4.1.2.- GIRO DENTADO.

El giro dentado (GD) es una estructura celular homogénea que junto al cuerno de Amón y el córtex parahipocampal, pertenece al complejo hipocampal. En su base se encuentra la zona subgranular (ZSG), un nicho germinal del SNC adulto que deriva embriológicamente de las paredes de los ventrículos laterales (Figura I14). El primordio del giro dentado es adyacente a la fimbria, un haz de axones eferentes de las neuronas piramidales de la capa CA3 que se continúa con el pilar posterior del fórnix hasta los tubérculos mamilares o hacia los núcleos septales como parte constituyente del sistema límbico (Roxo et al., 2011).

En adultos, la ZSG se compone de astrocitos radiales que reviste el borde interno de la capa (células B) y que emiten procesos radiales que atraviesan la capa celular del GD y se ramifica en profundidad de la capa molecular. Estas células B tienen capacidad de proliferación generando células inmaduras (células D) que son progenitores tempranos neurales de las neuronas granulares. Estos progenitores neurales migran en el espesor del GD y establecen conexiones sinápticas con otras neuronas del GD, la CA3 y las interneuronas del hilus contribuyendo a la plasticidad funcional del hipocampo en procesos como el aprendizaje y la memoria (Seri et al., 2001) (Figura I13 e I14).

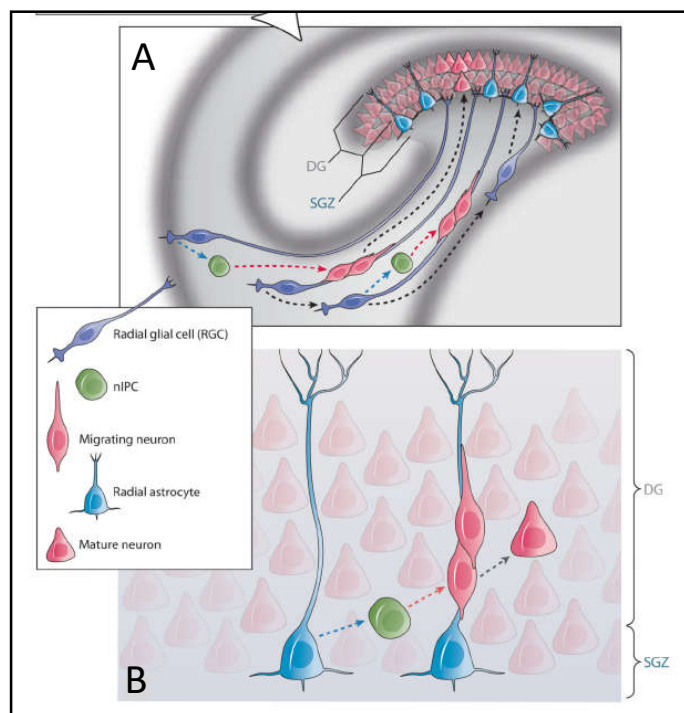


Figura I14: Tipos de progenitores y células derivadas en el Giro Dentado (DG) del hipocampo embrionario y adulto.

La zona subgranular (SGZ) deriva de las paredes laterales de los ventrículos.

(A): Vínculo entre la glía radial (morada) de la zona subventricular del ventrículo lateral y la zona subgranular en desarrollo. La glía radial migra desde esta región al tiempo que genera células progenitoras neurales intermedias (nIPC, verde) y neuronas jóvenes (rojo). La glía radial genera astrocitos radiales (azul) que se localizan en la zona subgranular con procesos prominentes que atraviesan la capa de células granulares y se anclan en la profundidad de la capa molecular.

(B): Astrocitos radiales o células tipo B (azul) generan nIPC o células tipo D (verde) que se diferencian a neuronas jóvenes (rojo) que permanecen asociadas a los procesos radiales de los astrocitos radiales antes de diferenciarse a células granulares (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009).

4.2.- PROGENITORES DE OLIGODENDROCITOS.

Las CPO son células restringidas al linaje glial y se caracterizan por expresar el proteoglicano NG2 en sus membranas celulares (Nishiyama et al., 2009). Constituyen una población de células multipotentes con capacidad de promover un reemplazo celular extensivo tanto de oligodendrocitos como de astrocitos y están ampliamente distribuidas en todo el SNC (Miller & Bai, 2007) constituyendo alrededor del 3-9% de todas las células del mismo. Además, las CPO constituyen alrededor del 75% de las células con capacidad proliferativa del SNC, aunque lo hacen de forma infrecuente. Su formación en un individuo adulto deriva de progenitores tempranos residentes en la SVZ y la ZSG del GD (Figura I15A) (Kang et al., 2010).

Ante una lesión inflamatoria aguda, isquemia o desmielinización en el SNC adulto, estas células se activan y proliferan rápidamente (Nait-Oumesmar et al., 1999, Gonzalez-Perez & Alvarez-

Buylla, 2011), aumentan de tamaño, cambian de morfología incrementando el número de ramificaciones y sobreexpresan el proteoglicano NG2. Además también aumenta la transcripción de factores asociados con la síntesis de mielina como Olig2 y Nkx2.2 y se diferencian a oligodendrocitos en siete días tras una lesión desmielinizante (Figura I15B) (Sellers et al., 2009). Además son capaces de migrar al cuerpo caloso, estriado, fimbria, fórnix y córtex (Menn et al., 2006; Kessarar et al., 2006). Por otro lado también son capaces de diferenciarse a astrocitos que forman la cicatriz glial en 24 horas después de una lesión.

La disponibilidad de CPO y de oligodendrocitos en el área desmielinizada es un factor clave que va a determinar el éxito de la remielinización, pues los oligodendrocitos maduros supervivientes tras la lesión, son células postmitóticas que no pueden replicarse en nuevos oligodendrocitos.

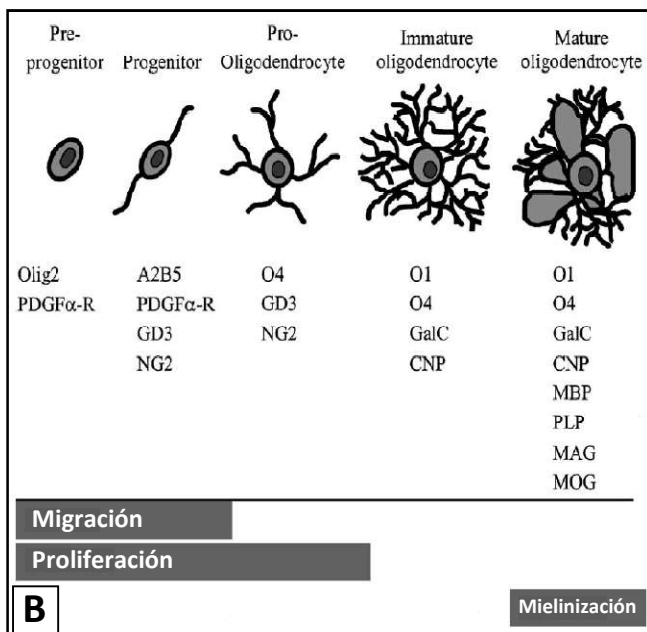
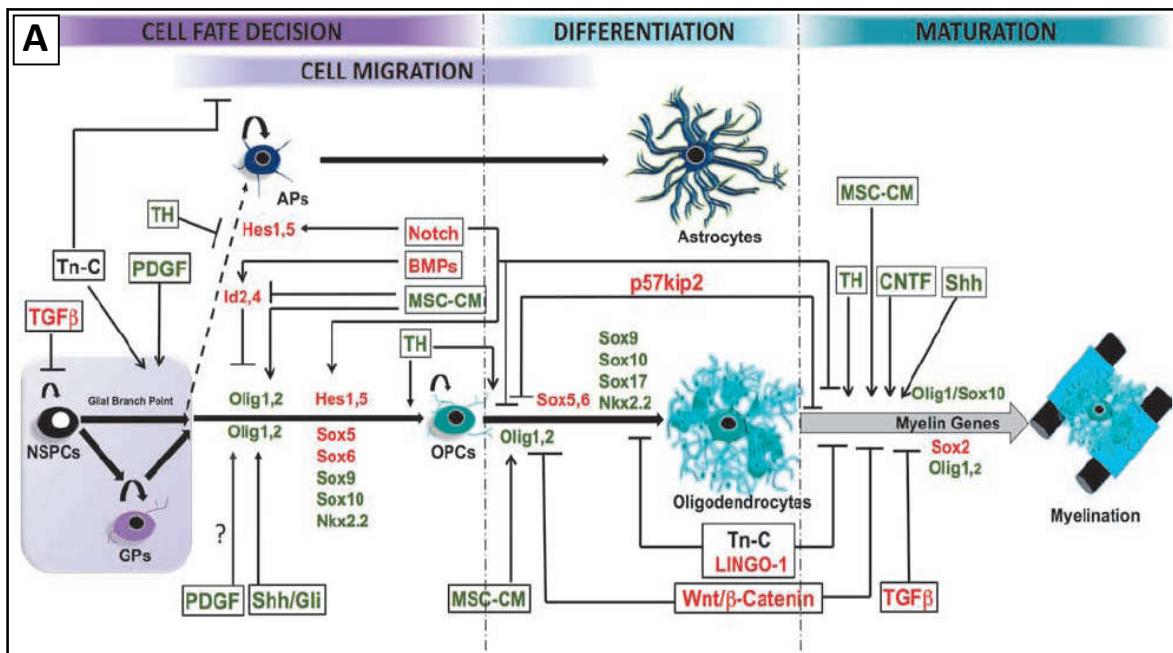


Figura I15: Programa Oligodrogénico.

(A): Los oligodendrocitos derivan de progenitores neurales (NSC) tras someterse a pasos secuenciales de determinación, especificación, diferenciación y maduración. Cuando la NSC toma la línea de diferenciación glial (recuadro morado) a través de progenitores gliales (GP), puede generar precusores astrocíticos (AP) o precusores oligodendrocíticos (OPC) que se diferenciarán a astrocitos u oligodendrocitos respectivamente. Los OPC migran y continúan un proceso de diferenciación pasando por oligodendrocitos inmaduros que madurarán a oligodendrocitos mielinizantes tras activar la expresión de genes de mielina. Este proceso es controlado por varios factores que inhiben (rojo) o activan (verde). Otros factores extrínsecos (cajas) pueden estimular (flechas) o inhibir (T) a los factores intrínsecos (sin cajas) (Rivera et al., 2010).

(B): Linaje oligodrogénico y sus marcadores específicos (Stangel & Hartung, 2002).

4.3.- DESMIELINIZACIÓN.

La desmielinización de los axones puede deberse a un daño primario en el que se ve afectado el oligodendrocito directamente, o a un daño secundario en el que primero hay una lesión axonal que es responsable del daño subsecuente que sufre el oligodendrocito que es dependiente de la liberación de factores tróficos del axón.

Los axones desmielinizados son vulnerables a daños por citotoxicidad por la disfunción de los canales iónicos y por daño mitocondrial. Además, la pérdida de mielina priva al axón del soporte neurotrófico local que le proporcionan los oligodendrocitos mediante la síntesis y liberación de crecimiento neural (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y de otros mecanismos tróficos mediados por contacto (Figura I16). Por este motivo la pérdida axonal en zonas desmielinizadas es mayor que en las que ya han sido remielinizadas (Kornek et al., 2000).

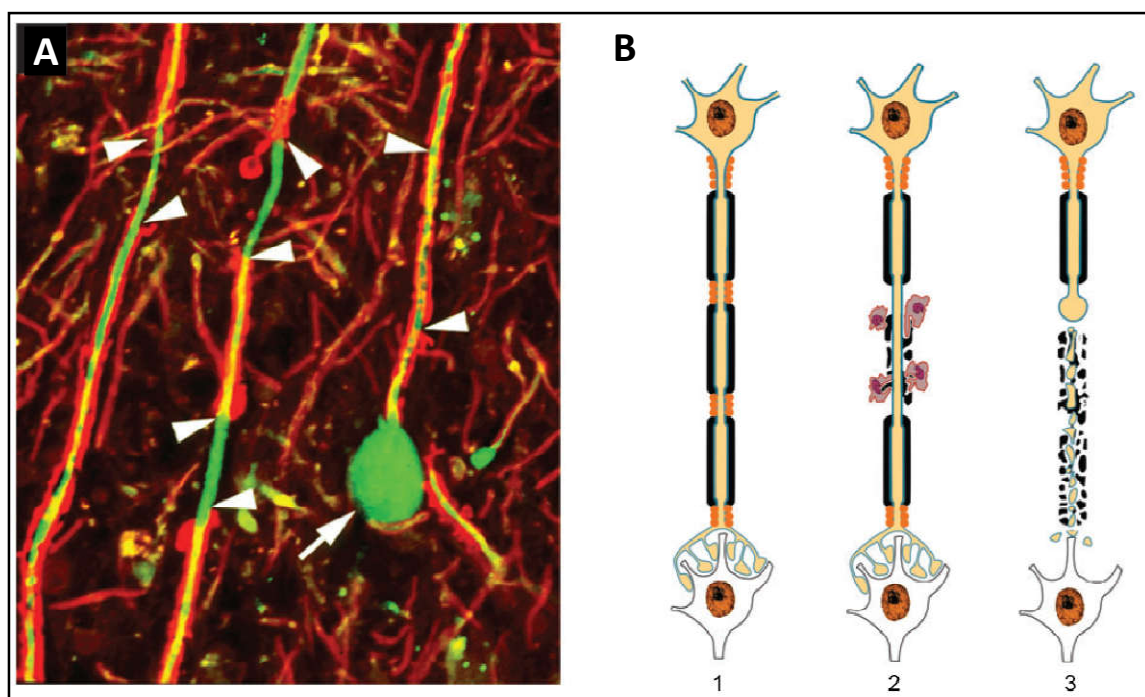


Figura I16: Lesión axonal durante la desmielinización inflamatoria.

(A): Imagen de microscopía confocal de una lesión desmielinizante activa en EM. En rojo se muestra proteínas de mielina; en verde los axones. Se observan áreas de axón desmielinizado mediado por microglía y monocitos (cabezas de flecha). El axón de la derecha muestra un bulbo de retracción axonal propio de una terminación proximal de un axón en degeneración.

(B): Representación de la degeneración axonal. 1: Axón con mielinización normal. 2: Desmielinización asistida por células del sistema inmune. 3: El extremo distal del axón interrumpido degenera rápidamente con los oligodendrocitos que lo recubren, mientras que el extremo proximal en contacto con el soma neuronal sobrevive. El transporte de moléculas y organelas se acumulan transitoriamente en el extremo proximal generando el bulbo que finalmente desaparece o degenera la neurona completa (Trapp & Nave, 2008).

Los oligodendrocitos que sobreviven a una lesión desmielinizante y que han perdido sus vainas de mielina no contribuyen a una remielinización posterior, pues aunque son capaces de sintetizar

una mielina compacta, no la pueden recolocar alrededor de los axones desmielinizados para formar nuevas envolturas. Por eso, un oligodendrocito que ya ha mielinizado un axón no lo puede hacer por segunda vez (Franklin, 2002).

En las lesiones desmielinizantes existe un ambiente celular y molecular con unas características propias que afecta negativamente a los mecanismos involucrados en la remielinización fisiológica de los axones afectados (Rivera et al., 2010):

- PSA-NCAM: se expresa en los axones desmielinizados y tiene efecto inhibitorio en la remielinización.
- Cicatriz glial: Es una densa red de prolongaciones astrocitarias que se forma alrededor de los axones desmielinizados y dañados en la fase hiperaguda de una lesión axonal y desmielinizante. Su función es estabilizar el tejido frente a la cascada de señales moleculares y celulares que amplificarían el daño a la neurona y oligodendrocitos, pero a largo plazo es responsable de la inadecuada regeneración de los axones dañados e impide físicamente el acceso de oligodendrocitos para formar nuevas vainas de mielina.
- Ruta de señalización notch-jagged: es un potente inhibidor de la diferenciación de CPO. Jagged está sobreexpresado en los axones desmielinizados y actúa sobre receptores Notch1 de los CPO inhibiendo su diferenciación a oligodendrocitos.
- Neuregulina: Es una molécula que se expresa en astrocitos y es necesaria para el desarrollo normal de oligodendrocitos. Está reducida en lesiones desmielinizante tanto activas como crónicas dificultando la remielinización.
- Hialuronano: Es un glicosaminoglicano presente en las lesiones de EM que inhiben la remielinización al inhibir la maduración de CPO.
- Integridad axonal: En las lesiones crónicas, los oligodendrocitos que no han degenerado tienen múltiples procesos que contactan con los axones. Sin embargo estos axones son distróficos y presentan múltiples áreas de edema axonal, por lo que no son receptivos y los oligodendrocitos no los pueden remielinizar (Chang et al., 2002).

4.4.- FASES DE LA REMIELINIZACIÓN.

La regulación de la remielinización se lleva a cabo por un complejo patrón temporal de expresión molecular que se ve influenciado por la edad, sexo y el tamaño de la lesión. A su vez, se ve influenciado tanto por la disponibilidad de CPO en la lesión, de la presencia de microglía y macrófagos, de la expresión coordinada y ordenada de moléculas reguladoras y de la habilidad de interacción de CPO con los axones de forma apropiada. Además, la integridad axonal es fundamental en la remielinización para permitir una correcta interacción axón-oligodendrocito.

La remielinización ocurre en tres fases (Chari et al., 2003b) (Figura I15):

- Fase de Activación de CPO: Después de la desmielinización, las CPO se activan por mitógenos secretados por astrocitos y microglía iniciando la síntesis de factores de transcripción oligodendrogénicos como Olig2, Nkx2.2 y SOX2 (Wang et al., 2013).

- Fase de Reclutamiento y Migración: Tras la activación, las CPO periféricas a la lesión proliferan, migran y colonizan las zonas desmielinizadas.

- Fase de Diferenciación: Seguidamente las CPO maduran a oligodendrocitos premielinizantes y contactan con los axones desmielinizados. Más tarde, se diferencian a oligodendrocitos maduros que formarán vainas de mielina funcionales alrededor de los axones (Franklin, 2002; Kotter et al., 2006).

Un error cualitativo en una de estas etapas puede impedir la remielinización. Además, el microambiente molecular que propicia el reclutamiento se ha de mantener el tiempo suficiente para permitir la repoblación de CPO en la lesión y así disponer de un número suficiente de células capaces de remielinizar todos los axones.

Una vez alcanzado este punto, el microambiente molecular debe variar para permitir y a la vez estimular la diferenciación de CPO a oligodendrocitos tempranos, que deben madurar y remielinizar los axones. A su vez, las CPO deben sobreexpresar los receptores de estas moléculas para poder responder a estos cambios.

Se han descrito diversos factores que regulan el proceso de supervivencia, proliferación, migración, diferenciación y maduración de CPO (Tabla I2), pero actualmente no se conoce al detalle cómo se regulan y se organizan todas estas señales para conseguir una remielinización funcional completamente guiada en laboratorio.

	Pre-progenitor	Progenitor	Pro-oligodendrocyte	Immature oligodendrocyte	Mature oligodendrocyte
Proliferation	PDGF- α	PDGF- α FGF-1 FGF-2 IGF-1 NT-3 Il-2	PDGF- α FGF-2 IGF-1 GGF	IGF-1 GGF	
Migration	PDGF- α	PDGF- α			
Differentiation		IGF-1 TGF- β	IGF-1 EGF	IGF-1 IGF-1	IGF-1 IGF-1
Survival		PDGF- α IGF-1 NT-3	PDGF- α FGF-2 IGF-1 NT-3 GGF	FGF-1 NT-3 CNTF LIF Il-6	NT-3 CNTF LIF Il-6

Tabla I2: Efecto de los factores de crecimiento sobre el linaje oligodendrocítico (Stangel & Hartung, 2002).

4.4.1.- REGULACIÓN EN EL RECLUTAMIENTO DE CPO.

Algunos factores de crecimiento actúan incrementando la proliferación y migración de CPO mientras que otros únicamente estimulan la proliferación o la migración. Además, cierta combinación de factores de crecimiento puede actuar sinérgicamente para conseguir estas acciones (Tablas I2 e I3):

- PDGF y FGF transforma los CPO O4 adultos con tasa de proliferación lenta, a progenitores O4 perinatales con tasa de proliferación elevada. A su vez estimula la migración hacia la fuente de dichos factores (Wolswijk & Noble, 1992).
- IGF y FGF2 estimulan la proliferación de CPO (Jiang et al., 2001).
- PDGF y la α -Integrina de la matriz extracelular estimulan la proliferación (Baron et al., 2002).

	SUPERVIVENCIA	PROLIFERACION	MIGRACION	DIFERENCIACION	MADURACION
TENASCINA C					
VITRONECTINA					
ANOSMINA 1					
CTGF					
BMP					
Noggin					
Id2 Id4					
Olig1 Olig 2 vía Sox 10 y Nkx2.2					
Jagged 1 o Delta 1 vía Notch-Hes					
TGF β 1					
p57kip2					
PKC					
RhoA					
ROCK2					
TirosinFosfatasa MKP5					
LINGO 1					
PDGF vía PDGFR α					
ERK 1/2					
HT vía RT α y β					
Shh vía patched-Olig 1/2					
Ciclopamina					
Sox 9					
Sox 10					
Sox 17					
Sox 2, 5, 6					
Células Mesenquimales					
Medio condicionado					
EGF+FGF2+PDGF					
PSA-NCAM					
Quimiocinas y citocinas					
IGF+FGF2					
PDGF+ FGF					
IGF 1					
FGF2					
GGF2					
Actividad Axonal y NT					
Hial4ronano					

Tabla I3: Programa Oligodendrogénico.

Efecto estimulador (verde) o inhibitor (rojo) que muestran algunos factores tróficos, interleucinas, receptores de membrana, factores de transcripción y moléculas de matriz extracelular sobre las fases del programa oligodendrogénico (ver texto).

4.4.2.- REGULACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE CPO.

Algunos factores estimulan la diferenciación de CPO a células maduras con capacidad de formar vainas de mielina, pero la maduración celular va ligada a la pérdida de la capacidad proliferativa y migratoria. Por otro lado, los factores que estimulan la proliferación inhiben la maduración:

- IGF1: Estimula la diferenciación oligodendroglial. Su sobreexpresión aumenta el número de oligodendrocitos, incrementa el grosor de la vaina de mielina y el número de axones mielinizados. Está sobreexpresado en las lesiones de EM (Genoud et al., 2005; Beck et al., 1995).
- FGF2: Inhibe la diferenciación a oligodendrocitos maduros y estimula la proliferación de CPO (Decker et al., 2005).
- GGF2: incrementa la proliferación e inhibe la diferenciación de oligodendrocitos inmaduros, pero es necesario en las fases finales de la diferenciación de oligodendrocitos para permitir la maduración. Está ausente en las lesiones activas de la EM (Armstrong, 2007).
- TGF- β 1: Inhibe la proliferación de CPO inducida por PDGF y FGF2, promoviendo por tanto la diferenciación de oligodendrocitos, además limita la neuroinflamación autoinmune (Voumvourakis et al., 2011; Bjarnadottir et al., 2016).
- Vitronectina: Molécula de la matriz extracelular que regula la fase final de la diferenciación de CPO promoviendo la formación de vaina de mielina (Rivera et al., 2010).
- Actividad eléctrica axonal y liberación de neurotransmisores estimulan la replicación, supervivencia y diferenciación de oligodendrocitos al tiempo que estimulan la mielinización. Esto se debe a que los CPO y los oligodendrocitos maduros expresan canales iónicos y receptores de neurotransmisores cuya activación o inhibición afecta a estos procesos (Rivera et al., 2010).

4.5.- REMIELINIZACIÓN EN EL CONTEXTO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

El grado de remielinización en las lesiones de EM se correlaciona con el número de oligodendrocitos y de macrófagos presentes. Este proceso ocurre a pocas semanas desde el comienzo de la lesión y ocurre al mismo tiempo que sigue produciéndose daño a las vainas de mielina restantes. Por el mismo mecanismo pueden dañarse las vainas de mielina recién formadas, apareciendo nuevas lesiones en áreas remielinizadas (Figura I17).

La remielinización en la EM progresa en dos fases dependiendo si las lesiones desmielinizantes están en fase aguda o crónica.

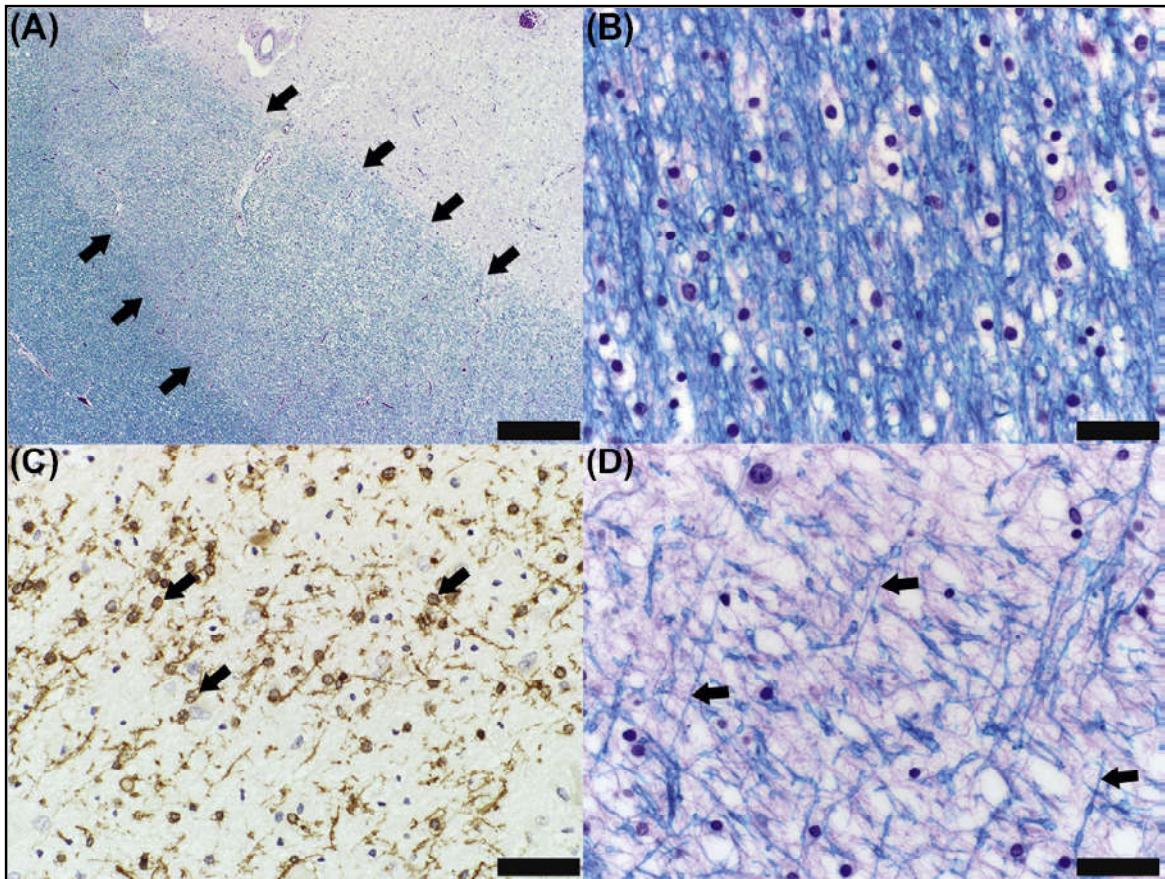


Figura I17: Remielinización.

(A): La remielinización se puede observar como placas circunscritas con tinción frente a mielina más pálida (región delimitada por las flechas) que la que aparece en la sustancia blanca normal (zona inferior izquierda). En la zona superior derecha se observa una placa desmielinizada.

(B): Tinción de mielina de la sustancia blanca normal.

(C): Oligodendrocitos inmunorreactivos para MAG que forman finas vainas de mielina alrededor de los axones de una placa remielinizada.

(D): Tinción de mielina mostrando axones con finas vainas de mielina en placas de remielinización. Comparar con mielinización normal en (B).

A, B y D: Tinción Luxol fast blue/hematoxilina y eosina. Escalas: 500 μ m en A; 50 μ m en B-D (Popescu & Lucchinetti, 2016).

4.5.1.- LESIONES AGUDAS.

En la fase aguda, las CPO periféricas invaden el área lesionada y se diferencian a oligodendrocitos maduros capaces de remielinizar espontáneamente los axones desmielinizados en tan solo 7 días (Chari et al., 2003a).

La inflamación estimula la remielinización. En las lesiones agudas la respuesta inflamatoria es mayor por lo que la remielinización también es más eficaz. Esto es así porque los macrófagos y la microglía producen factores de crecimiento que median en la reparación, al tiempo que eliminan los restos de mielina dañada facilitando el contacto de las CPO con los axones. Los fármacos antiinflamatorios inhiben la diferenciación de CPO a oligodendrocitos maduros si se

administran de forma crónica, por lo que su uso continuo incrementa la pérdida de axones no mielinizados. Sin embargo no afecta a la colonización de la lesión por las CPO (Chari et al., 2003b).

4.5.2.- LESIONES CRÓNICAS.

Las lesiones crónicas de la EM pueden ser de dos tipos: en unas no existen CPO debido a un fallo en el reclutamiento, mientras que en otras sí se observan CPO, pero éstos son quiescentes debido a un fallo en la maduración.

- En las lesiones crónicas con ausencia de CPO se produce un colapso de los mecanismos de migración de estos progenitores (Williams et al., 2007) debido, bien a la carencia de factores que estimulan la migración o bien por la presencia de moléculas que la inhiban. Estos hechos propicia la formación de un nicho molecular que bloquea la regeneración histológica (Kuhlmann et al., 2008) y por tanto la recuperación funcional (Bunge, 2001).

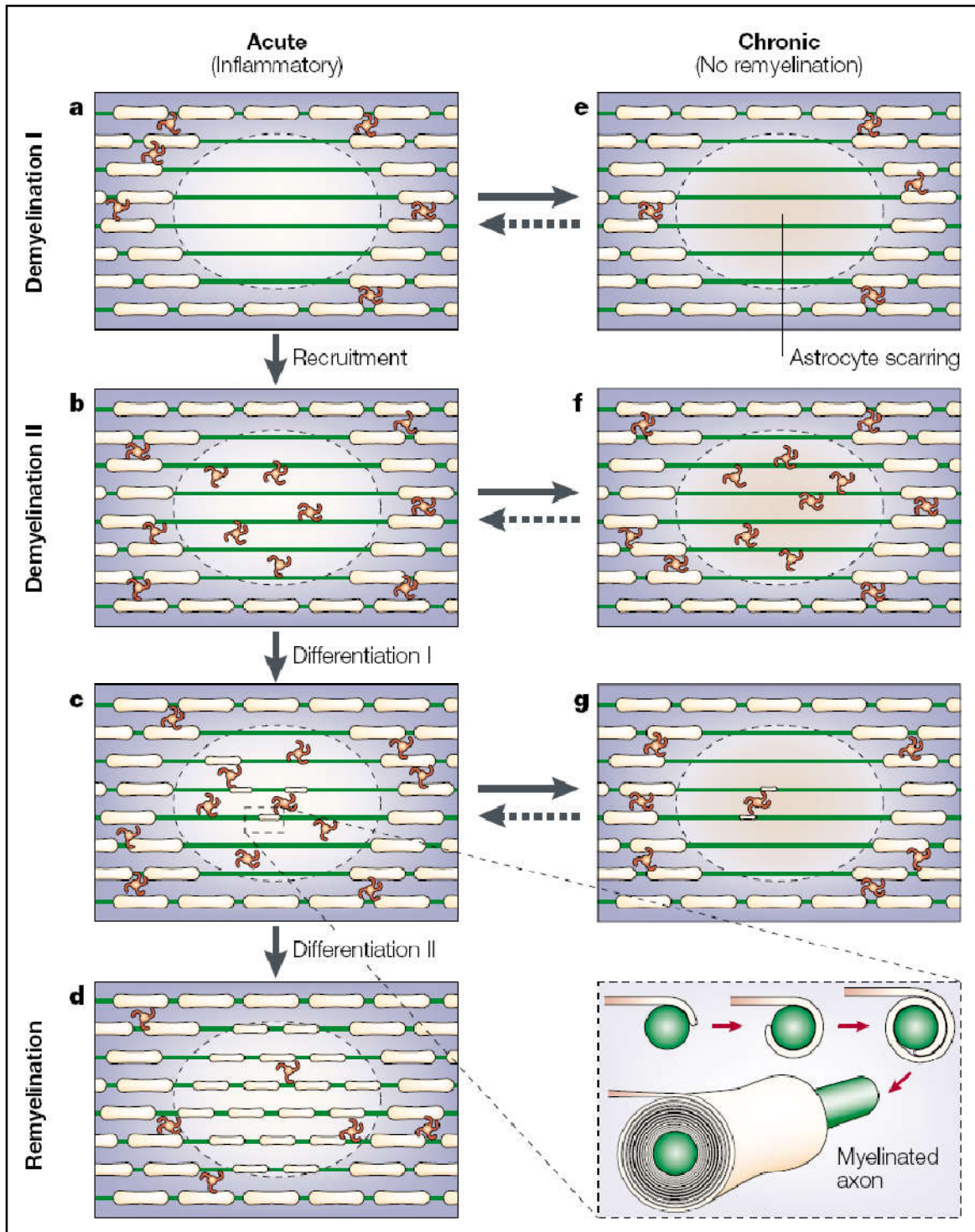
Además, tras varios episodios de desmielinización y remielinización disminuye la población de CPO en las áreas lesionadas y la repoblación por CPO periféricas se ralentiza y pierde eficacia a medida que avanza la edad del paciente. Por otro lado, como la inflamación aguda es lo que proporciona un mayor estímulo para la atracción de CPO, al disminuir ésta con el tiempo, se requieren meses para que grandes áreas desmielinizadas estén completamente repobladas de CPO restringiéndose la remielinización únicamente en las zonas periféricas (Williams et al., 2007).

- En las lesiones crónicas con presencia de CPO, éstos son quiescentes y no tienen capacidad de maduración debido a la insuficiencia de factores que la estimulen o porque las CPO se vuelven más insensibles a estos factores (Figura I18).

Figura I18 (página siguiente): Patología de la remielinización en EM.

Un episodio inflamatorio agudo daña los oligodendrocitos, las vainas de mielina y algunas veces las CPO (a), mientras que en otros casos no se ven afectadas (b). La primera etapa de la remielinización requiere el reclutamiento de CPO: en (a) deben migrar a la lesión y proliferar, mientras que en (b) en reclutamiento solo consiste en proliferación. Tras esa fase las CPO deben contactar con los axones desmielinizados antes de comenzar el proceso de diferenciación (c) mediante el cual se genera una vaina de mielina que en algunos casos envuelve y se compacta alrededor del axón (recuadro) remielinizando el área lesionada (d). Si el ambiente molecular que dirige este proceso es erróneo, la lesión permanecerá crónicamente desmielinizada y se formará en ella una cicatriz astrogliar (e), que dependiendo de la fase donde se produzca el error, puede ser deficiente (f) o contener CPO (e) o incluso contener oligodendrocitos premyelinizantes (g). Para que un tratamiento remielinizante sea eficaz se debe crear un ambiente favorable (flechas rotas) (Franklin, 2002).





4.6. FISIOLÓGÍA DE LA REMIELINIZACIÓN.

La remielinización tras un proceso desmielinizante, es superponible al proceso neonatal pues los mecanismos regenerativos son similares a los eventos que ocurren durante el desarrollo, exceptuando la existencia de un ambiente patológico con macrófagos, linfocitos T y astrocitos.

La vaina de mielina formada es funcional aunque más corta y fina en relación al diámetro axonal respecto a la neonatal. Ésta característica viene definida por el G-ratio que es la relación del diámetro axonal respecto al grosor de la vaina de mielina. En los axones remielinizados este valor es mayor respecto a los axones de mielinización embrionaria, pues disminuye el grosor de la envoltura de mielina. Ésta diferencia es muy clara en los axones largos, pero menos evidente en los axones de diámetro pequeño como los que existe en el cuerpo calloso, donde el G ratio de los axones remielinizados es indistinguible de los normales (Smith et al., 1982).

Además la longitud de los internodos es más corta perdiéndose de este modo la relación entre el diámetro de la vaina de mielina y la longitud internodal respecto el tamaño del axón (Franklin & Ffrench-Constant, 2008). Sin embargo la distribución iónica de los canales en los internodos es normal, por lo que se restablecen las propiedades de conducción al tiempo que se proporciona soporte trófico y se disminuye la vulnerabilidad neuronal al ambiente adverso de la lesión (Aktas et al., 2010).

5.- MODELOS EXPERIMENTALES DE DESMIELINIZACIÓN.

Existen múltiples modelos animales de EM. Cada uno de ellos aborda de forma específica una característica propia de la patogenia molecular de la EM. Se clasifican en modelos inmunológicos, virales, genéticos y tóxicos.

En los modelos inmunológicos, la desmielinización y la remielinización ocurren simultáneamente siendo por tanto un modelo más parecido a lo que ocurre en la EM. Sin embargo es difícil diferenciar la remielinización que ocurre fisiológicamente a la remielinización que es secundaria al tratamiento experimental a estudio.

En los modelos tóxicos, desmielinización y remielinización están separados en el tiempo, algo que no ocurre en la EM pero permite un estudio óptimo de los mecanismos de la remielinización fisiológica y de las posibles terapias remielinizantes a estudio. Además, en algunos casos de EM se ha descrito una apoptosis masiva de oligodendrocitos en ausencia de inflamación, proceso característico de estos modelos.

5.1.- MODELOS AUTOINMUNES.

La Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) es el modelo que se utiliza con mayor frecuencia en estudios de investigación básica. Para ello, en el animal de experimentación se administran sistémicamente antígenos de mielina como MBP, PLP, proteína oligodendrocítica de mielina (MOG), o bien se realiza una transferencia de linfocitos T activos frente antígenos de

mielina. En ambos casos aparecen lesiones de desmielinización diseminadas en el SNC con infiltración de macrófagos y linfocitos T, con un curso clínico similar a la EM. Además, también existe pérdida axonal asociada a la desmielinización y en consecuencia cursa con déficit neurológico crónico.

Mediante este modelo se pueden inducir todas las formas clínicas de EM. Sin embargo la respuesta inmune se lleva a cabo por las células Th1/Th17 CD4+, mientras que en la EM mayoritariamente están involucradas las células Tc CD8+. Además, los mecanismos patogénicos en la fase progresiva de la EM no es comparable a la evolución de la EAE (Flugel et al., 2001).

5.2.- MODELOS VIRALES

La inyección del Picornavirus de la Encefalomiелitis Murina de Theiler produce lesiones desmielinizantes asociadas a la replicación viral en los oligodendrocitos. En una fase temprana produce una encefalitis subletal y en una fase tardía el virus infecta también células inflamatorias, astrocitos y oligodendrocitos con desmielinización focal y daño axonal (Perlman & Zhao, 2017).

La inyección de Coronavirus de la Hepatitis Murina provoca una desmielinización inflamatoria en ausencia de replicación viral (Perlman & Zhao, 2017), y la inyección de proteínas virales de Retrovirus Endógeno Humano también induce una desmielinización con patogénesis similar a la EM.

5.3.- MODELOS GENÉTICOS

Existen varios modelos genéticos en los que se ven afectados genes implicados en la formación de la vaina de mielina. En la rata deficiente en PLP, Shaking y Jimpy, está afectado el gen que codifica para PLP, cuya herencia está ligada al cromosoma X (Nave et al., 1986). En los modelos Shiverer y Quaking está afectado el gen que codifica MBP, cuya herencia es autosómica recesiva (Roach et al., 1985).

5.4.- MODELOS TÓXICOS

Tienen la ventaja de poder realizar lesiones en una localización determinada altamente reproducible en tiempo y espacio, lo que lo convierte en un modelo ideal para estudiar el proceso de remielinización. Además, tras suspender el tratamiento se activan los mecanismos de remielinización fisiológicos permitiendo estudiar este proceso.

5.4.1.- BROMURO DE ETIDIO:

Inyectado intraparenquimalmente elimina las células nucleadas al intercalarse de forma inespecífica entre las bases de DNA (Baker & Amor, 2015). Al ser inyectado en la sustancia blanca, se afectará de forma precisa a oligodendrocitos y astrocitos, mientras que las neuronas permanecen viables, aunque desmielinizadas parcialmente, pues su soma está alejado del área tóxica.

5.4.2.- LISOFOSFATIDILCOLINA

Desmieliniza los axones preservando astrocitos en ausencia de respuesta inmune. Tras la lesión, comienza una remielinización completa de la lesión predecible de forma espacio-temporal (Miller & Fyffe-Maricich, 2010).

5.4.3.- CUPRIZONA

La cuprizona (bis-ciclohexanonaóxaldihidrazona) es un agente quelante de cobre que afecta al complejo mitocondrial IV. Se administra vía oral destruyendo selectivamente oligodendrocitos maduros provocando así una desmielinización en parches de patrón no reproducible de forma similar a lo que ocurre en la EM (Stidworthy et al., 2003).

En éste método no se inyectan intraparenquimalmente las toxinas desmielinizantes, evitando la ruptura de la BHE, el daño y la respuesta inflamatoria secundaria a la lesión. Además, permite estudiar los procesos que ocurren durante la remielinización con independencia de la implicación que las células del sistema inmunitario tienen en los modelos inmunológicos.

La cuprizona afecta preferentemente el cuerpo caloso y a la fimbria. Dos estructuras que con frecuencia se afectan en los pacientes con EM y que están próximas a la SVZ y ZSG del GD, nichos neurogénicos en el SNC adulto, por lo que permite estudiar su activación ante una lesión desmielinizante próxima.

El tratamiento durante 6 semanas con cuprizona permite simular las lesiones agudas de la EM, con remielinización fisiológica al suprimir el tratamiento. Sin embargo, si el tratamiento se prolonga durante 12 semanas se eliminan las CPO, afectando así la capacidad de autorregeneración del tejido lesionado de forma similar a lo que ocurre en las lesiones crónicas de la EM (Figura I19).

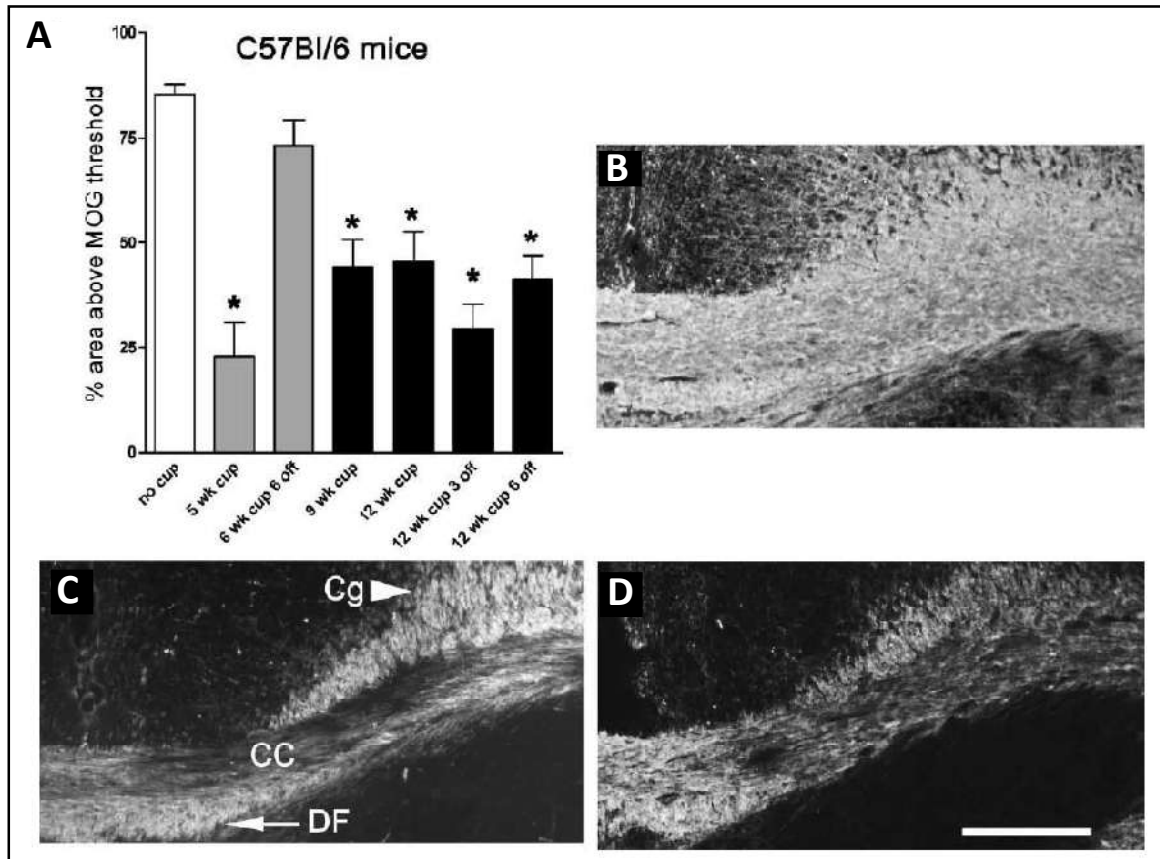


Figura 119: Ausencia de remielinización espontánea tras desmielinización crónica con cuprizona.

(A): Estimación de MOG por inmunofluorescencia en el cuerpo caloso. Tras un tratamiento agudo con cuprizona de 6 semanas (barras grises), se recuperan los valores normales de MOG tras otras 6 semanas de interrupción de tratamiento. Sin embargo, tras un tratamiento con cuprizona de 12 semanas (barras negras), no aumentan los valores de MOG tras 6 semanas de interrupción. La barra blanca indica los valores normales de MOG. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores normales.

(B-D): Inmunodetección de MOG en el cuerpo caloso en secciones coronales. (B): Control sin tratamiento desmielinizante; (C): Tratamiento de 12 semanas con cuprizona; (D): Tratamiento de 12 semanas con cuprizona seguidos de 6 semanas de recuperación.

Cc: Cuerpo caloso; DF: Fórnix dorsal; Cg: cíngulo. Escala en B, C y D: 250 μ m (Armstrong et al., 2006).

6.- TERAPIA CELULAR.

6.1.- GENERALIDADES.

El tratamiento de la EM debe ser abordado desde tres perspectivas diferentes. Por un lado se deben impedir los mecanismos autoinmunes e inflamatorios causantes de la enfermedad; por otro se deben impedir los mecanismos responsables de la neurodegeneración progresiva; y finalmente se debe restaurar la mielina degradada para restaurar la funcionalidad del SNC dañado durante los años de evolución de la enfermedad (Rivera & Aigner, 2012).

Sobre éste último punto, existen dos estrategias encaminadas a restaurar la mielina: trasplante de células con capacidad de formación de vainas de mielina, o estimulación de los mecanismos endógenos de regeneración y reparación de la misma mediante la estimulación de los nichos neurogénicos existentes (Franklin & Ffrench-Constant, 2008; Franklin & Kotter, 2008).

Actualmente se disponen de gran variedad de tratamientos experimentales en el que se utilizan varios tipos celulares, tanto maduros como inmaduros, capaces de remielinizar el área desmielinizada y restaurar la conducción saltatoria del impulso nervioso: CPO, células de Schwann, glía envolvente olfatoria y células madre (neurales, embrionarias y derivadas de la médula ósea) (Goldman, 2005).

Se deben cumplir una serie de requisitos para que una terapia celular sea óptima para su traslado a clínica (Chari, 2007):

- No deben ser diana de la patogenia desmielinizante.
- Capacidad de proliferación en cultivo o disponer de un número suficiente para mediar la remielinización, pues su potencial remielinizante es dependiente del número de células del que se dispone.
- Capacidad de supervivencia a la astrogliosis que se produce tras el trasplante.
- Capacidad de migración por el SNC, ya que la EM es una enfermedad multifocal.
- Estabilidad genética y seguridad biológica de las células trasplantadas (deben de carecer de patógenos y de potencial teratógeno).
- Ausencia de rechazo de las células trasplantadas.
- Normativa ética aceptada socialmente en cuanto al origen de las células trasplantadas.

6.2.- TERAPIAS DE REEMPLAZO CELULAR.

- El trasplante de CPO embrionarios, fetales o adultos promueven remielinización y recuperación funcional en varios modelos de desmielinización, pero al trasplantarlos en el SNC poseen una elevada tasa de mortalidad (Czepiel et al., 2015). Además, se debe conseguir una depleción mayor al 50% de las CPO endógenas para permitir la colonización de las trasplantadas.

- El trasplante de células de Schwann tiene una mayor tasa de supervivencia que las CPO u oligodendrocitos maduros y además no están afectados en la EM. Son capaces de sintetizar vainas de mielina funcionales que restauran la conducción nerviosa saltatoria. Sin embargo presentan una escasa capacidad de integración en el parénquima del SNC y se ven afectados por la astrogliosis, permaneciendo agrupadas en el lugar de inyección (Franklin et al., 2002).

- El trasplante de Glía Envolvente Olfatoria posee mayor capacidad de integración, remielinizan y promueven regeneración axonal, restableciendo la velocidad de conducción saltatoria. Son un

tipo celular similar a las células de Schwann con características mixtas con células astrogliales. Sin embargo tienen una capacidad proliferativa muy baja y únicamente se encuentran en el bulbo olfatorio, por lo que su fuente de obtención es muy limitada (Franklin et al., 1996).

- El trasplante de Progenitores Neurales Embrionarios posee mayor supervivencia e integración celular, aunque posee una baja expresión de marcadores oligodendrogliales a lo largo de su diferenciación. Tienen potencial teratogénico y su fuente de obtención es éticamente cuestionable (Brustle et al., 1999).

- El trasplante de Células Progenitoras de tejido adulto posee la ventaja de que existen gran variedad de tejidos donde existe una población celular con capacidad de regenerar los tipos celulares que los componen. Se trataría de una fuente celular que se obtendría del propio paciente, evitando así los mecanismos de rechazo al trasplante. Además, su fuente de obtención es aceptada éticamente. Sin embargo estas células se deben purificar y expandir in vitro al tiempo que se deben reprogramar a células con capacidad de sintetizar mielina mediante un complejo programa molecular de desdiferenciación (Nistor et al., 2005).

- El trasplante de Células Madre Hematopoyéticas (CMH) utiliza una fuente celular ubicada en los nichos formados por células mesenquimales de la médula ósea. Tienen la capacidad de autorrenovarse a lo largo de la vida adulta y se diferencian a precursores de la línea linfóide (de la que derivan los linfocitos T y B) y mieloide (de la que derivan el resto de elementos celulares de la sangre). Para aplicar eficientemente esta terapia ese deben destruir previamente los linfocitos T aberrantes del paciente para reconstituir posteriormente su sistema inmunitario con linfocitos T no inmunorreactivos mediante el trasplante halogénico de CMH. Las CMH se obtienen en sangre periférica tras su movilización de la médula ósea mediante la administración del factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) y ciclofosfamida. Se inmunopurifican seleccionándolas por su antígeno de membrana CD34. Se debe destruir radio o farmacológicamente la médula ósea del paciente (mieloablación) para seguidamente realizar la infusión de las CMH extraídas y reconstituir así la médula ósea (Carreras et al., 2003). Actualmente se prefiere evitar la mieloablación y restringir la quimioterapia hacia la erradicación de la población de células T (Burt et al., 2006), algo que por sí mismo frenaría la progresión de la EM, a lo que suma el efecto inmunomodulador del trasplante de CMH.

- De forma similar a los que sucedía con el trasplante de CPOs, el trasplante de oligodendrocitos maduros presenta una elevada mortalidad de estas células dentro del SNC adulto. Además, los oligodendrocitos adultos que han perdido su vaina de mielina en el proceso de purificación y cultivo celular, son incapaces de formar nuevas vainas de mielina que envuelvan axones desmielinizados, siendo por tanto necesario disponer de una forma más inmadura de oligodendrocito para que se establezcan las interacciones adecuadas axón-oligodendrocito para tal fin. La elevada mortalidad celular puede subsanarse obteniendo líneas celulares de

oligodendrocitos inmortalizados, tal es el caso de la línea de oligodendrocitos inmortalizados 158N obtenida en el laboratorio del Dr. M. Said Ghandour (Feutz & Ghandour, 2001), consiguiendo una línea de oligodendrocitos estables, con un ciclo celular similar al del resto de células gliales en el SNC y que expresan los marcadores típicos de oligodendrocitos.

6.3.- TERAPIAS DE ESTIMULACIÓN DE LA REGENERACIÓN.

Los inconvenientes que surgen del uso teórico de estos tipos celulares incentivan a encontrar una terapia capaz de estimular los mecanismos de regeneración endógena del propio tejido desmielinizado promoviendo la migración y diferenciación de CPO.

Como se ha comentado en apartados anteriores, las fases que componen el proceso de remielinización pueden ser estimuladas por diversos factores tróficos que frecuentemente tienen efectos antagónicos entre sí a lo largo de todo el proceso, por lo que es poco viable desarrollar una monoterapia con solo una de estas moléculas, ya que factores que regulan la proliferación y atracción de CPO, a su vez inhiben la diferenciación, maduración y viceversa (Kumar et al., 2007).

La infusión coordinada espacio-temporalmente de un conjunto de factores implicados en los procesos de atracción y diferenciación de CPO puede ser una solución, pero la infusión intraparenquimal tiene una ventana temporal muy limitada y requeriría infusiones continuas en el lugar lesionado.

6.4.- CÉLULAS MESENQUIMALES.

6.4.1.- CARACTERÍSTICAS.

Las células mesenquimales (MSCs) son una población de células estromales relativamente rara en la médula ósea (1 célula por cada 10000 células) que tienen potencial osteogénico (Friedenstein et al., 1976). En este contexto proporcionan un soporte trófico para las colonias de CMH al tiempo que regulan su actividad mediante mecanismos paracrinos, por lo que son necesarias para el mantenimiento y expansión fisiológica de las CMH en la médula ósea (Mendez-Ferrer et al., 2010). En individuos adultos se encuentran mayoritariamente en la médula ósea, tejido adiposo, tejido sinovial y en escasas ocasiones en la sangre periférica (Minguell et al., 2001). También se pueden aislar de la sangre de cordón umbilical, ligamento periodontal, pulpa dental y dientes deciduales.

En cultivo tienen la propiedad de adherirse al plástico adquiriendo morfología de fibroblastos fusiformes. Carecen de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD11, CD14, y

presentan en su superficie marcadores específicos como SH2, SH3, SH4, CD29, CD44, CD71, CD90 y CD106 (Tanavde et al., 2015).

En 2006 el comité de células Madre de Tejido y Mesenquimales de la Sociedad Internacional para Terapia Celular estableció unos criterios mínimos para definir las MSCs humanas (Horwitz, 2005; Dominici, 2006):

- En cultivo deben tener la capacidad de adhesión al plástico.
- Más del 95% de la población celular debe expresar los marcadores CD105, CD73 y CD90 por citometría de flujo.
- Menos del 2% de la población debe expresar el marcador CD45 panleucocitario, CD34 de progenitores hematopoyéticos, CD14 y CD11 de monocitos y macrófagos, CD79 y CD19 de células B y el HLA de clase II.
- Capacidad multipotencial de diferenciación *in vitro*: condrogénica, adipogénica y osteogénica, que ha de ser demostrable mediante marcadores específicos.

6.4.2.- PLASTICIDAD Y SECRETOMA.

Las MSC son un tipo celular muy accesible, abundante y con capacidad de generar células de la estirpe mesenquimal como condroblastos, mioblastos esqueléticos, osteoblastos y adipocitos (Pittenger et al., 1999). En diversos estudios han demostrado ser potencialmente efectivas en el tratamiento de diversas enfermedades sin causar efectos negativos graves (Uccelli et al., 2012).

Además, tras cultivarse en medios de cultivo específicos se han conseguido diferenciar a células de la estirpe neuroectodérmica pero, aunque adquieren marcadores de origen neural, no tienen funcionalidades típicas de neuronas o glía. Además, no se ha conseguido su diferenciación hacia tejido endodérmico y por tanto únicamente adquieren la categoría de células multipotentes con capacidad de autorrenovación, pero no la categoría de células madre pluripotentes (Sanchez-Ramos et al., 2000).

Al trasplantarlas en el SNC son viables durante largos períodos de tiempo, tienen baja capacidad de migración, promueven regeneración, neuroprotección y estimulan el crecimiento axonal posibilitando la recuperación funcional ante lesiones del SNC (Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2004). Además poseen potencial neurogénico y pueden diferenciarse a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, pero no microglía (Hermann et al., 2004; Krampera et al., 2007). Sin embargo, esto sucede en un bajo porcentaje de casos por lo que esta propiedad no debe considerarse para su uso terapéutico.

Las MSC producen un amplio rango de moléculas solubles involucradas en inmunomodulación, antiapoptosis, angiogénesis, estímulo de la proliferación y diferenciación celular, anticicatrizal y

quimiotáctico. Estas moléculas constituyen en su conjunto el llamado Secretoma de las MSC (Konala et al., 2016; Bruno et al., 2015; Drago et al., 2013) y posee potencial terapéutico en múltiples patologías (Zimmerlin et al., 2013) a través de los efectos paracinos que ejercen citocinas, factores de crecimiento, quimiocinas, moléculas de matriz extracelular, proteasas, mediadores lipídicos, RNA mensajeros y micro RNA que lo componen (Tabla I4). Sin embargo, la composición del secretoma es distinto según el nicho fisiológico donde se encuentren las células, bien en cultivo o una vez trasplantadas en diversos ambientes tisulares (Ranganath et al., 2012), e incluso difiere según la edad del donante (Turinetto et al., 2016).

SECRETOMA de las CELULAS MESENQUIMALES						
	INMUNOMODULACION	APOPTOSIS	ANGIOGENESIS	CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION DE SC	FIBROSIS	QUIMIOATRACCION
CPA	PGE-2	VEGF	VEGF	SCF	HGF	CCL2-6, 20, 26
	HLA-G5	HGF	IGF-1	LIF	bFGF	CX3CL1
LINFOCITOS T y B	HGF	IGF-1	PIGF	M-CSF	ADM	CXCL1, 2, 5, 8, 10-12
	iNOS	Stanniocalcina-1	MCP-1	SDF-1		
	PGE-2	TGF- β	bFGF	Angiopietina-1		
	TGF β	bFGF	IL-6	Activina A		
	bFGF	Activina A				
	IDO	GM-CSF				
NK	IDO					
	PGE-2					
	TGF β					
Treg	LIF					
	TGF β					

Tabla I4: Factores solubles secretados por las MSC (secretoma).

En rojo efecto inhibitorio. En verde efecto estimulador. CPA: Célula presentadora de antígeno; NK: Linfocito Natural Killer; Treg: Linfocito T regulador. (Basado en el texto de Figueroa et al., 2012).

6.4.3.- CÉLULAS MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO DENTARIO.

Las MSCs derivadas del tejido dentario merecen una mención especial, pues son células ectomesenquimales que derivan de la cresta neural embrionaria de origen neuroectodérmico (Chai et al., 2000), mientras que las MSCs de la médula ósea derivan del tejido mesodérmico (Musina et al., 2006).

Dentro del tejido dentario adulto pueden ser extraídas a partir de la pulpa dental (DP-SC) y el ligamento periodontal (POL-SC) (Gronthos et al., 2000; Seo et al., 2004). Tienen capacidad de formación de dentina y cemento respectivamente, componentes básicos de la estructura dental.

Tanto las DP-SC como las POL-SC son células multipotentes con alta capacidad de proliferación que al cultivarlas en medio basal expresan los antígenos mesenquimales típicos, pero además, debido a su origen neuroectodérmico expresan marcadores de precursores neurales como Nestina, GFAP y de células progenitoras de cresta neural como Slug, Twist and Sox9 (Bueno et al., 2013). Tienen mayor potencial antiinflamatorio e inmunomodulador que otros tipos de MSCs (Földes et al., 2016), y si se cultivan en medio neurogénico expresan neurofilamentos, marcadores neuronales (Bueno et al., 2013) y generan corrientes de Na y K (Ben Mead et al.,

2017). Además, si se trasplantan en tejido nervioso son capaces de sobrevivir, migrar e integrarse en nichos neurogénicos del SNC adulto (Bueno et al., 2013).

6.4.4.- POTENCIAL TERAPEUTICO DE LAS MSC EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE.

Las MSC son candidatas para el uso en el tratamiento de diversas patologías ya que pueden obtenerse de la médula ósea del propio paciente para su uso autólogo y evitar así la inmunosupresión que conllevaría una terapia celular heteróloga. Además pueden ser cultivadas fácilmente y se pueden expandir hasta obtener grandes cantidades celulares con bajo riesgo (respecto a otros tipos de células madre neurales) de adquirir mutaciones malignas, tras varios pases de cultivo (Karussis et al., 2008, Karussis & Kassis, 2008).

Por otro lado, las MSC estimulan la proliferación y diferenciación de células progenitoras propias del tejido lesionado hacia neuronas maduras (Zhang et al., 2004) y hacia oligodendrocitos (Rivera et al., 2006). También poseen efecto neuroprotector (Barhum et al., 2010) y modulan la respuesta inmunitaria induciendo una respuesta inmune antiinflamatoria Th2 (Bai et al., 2009; Gerdoni et al., 2007), secretan moléculas propiamente antiinflamatorias e intervienen en la proliferación y diferenciación de linfocitos B (Uccelli et al., 2006). Además, en trabajos previos en nuestro laboratorio hemos observado que son capaces de evitar la degeneración de neuronas de Purkinje en un modelo de ataxia cerebelosa mediante mecanismos de fusión celular y secreción de factores neurotróficos (Jones et al., 2010).

Todas estas actividades están mediadas por factores solubles sintetizados por las MSC, entre los que se encuentran FGF2, VEGF, IGF1, TGF β 1, CNTF, IL6, NT3, BDNF y NGF (Caplan, 2007). Estos factores podrían explicar por sí mismos el efecto oligodendrogénico que ejercen sobre las células madre neurales (CMN) al incrementar en ellas la expresión de factores de transcripción Olig1, Olig2 y Nkx 2.2, involucrados en el programa de diferenciación de CMN a oligodendrocitos. Además, estos factores estimulan la maduración de oligodendrocitos a células formadoras de mielina (Rivera et al., 2009), pudiéndose incluso incrementar la remielinización, inyectando en un SNC desmielinizado el medio donde se han cultivado las MSC (Rivera et al., 2008).

Con ello, las MSC consiguen formar un ambiente prooligodendrogénico que facilitaría los procesos de remielinización mediante la liberación de señales instructivas de la diferenciación oligodendroglial (Rivera et al., 2006) a la vez que regulan la proliferación, apoptosis, migración y diferenciación de células progenitoras endógenas (Caplan, 2007).

Por otro lado, las MSCs presentan propiedades antiapoptóticas, pueden actuar como células presentadoras de antígenos y ejercen efectos antiinflamatorios, modulando así la respuesta inmune (Földes et al., 2016), e incluso podrían intervenir en la respuesta inmunopatológica de la

EM regulando los procesos inflamatorios y oxidantes propias de esta entidad, ejerciendo así efecto neuroprotector.

6.4.5.- ENSAYOS CLÍNICOS Y MEDICINA REGENERATIVA.

La medicina regenerativa es una rama de la medicina que aplica los conocimientos sobre células madre y su capacidad de reparar, reemplazar o regenerar células, tejidos u órganos dañados restaurando una función perdida. Para ello se utilizan moléculas, terapia génica, trasplante celular, ingeniería de tejidos y reprogramación celular (Mason & Dunnill, 2008).

La evidencia obtenida en estudios preclínicos sobre el potencial terapéutico de las MSC ha incentivado el desarrollo de estudios clínicos. El primer ensayo que utilizó este tipo celular fue para tratar osteogénesis imperfecta (Horwitz et al., 1999), posteriormente se estudió en enfermedades de almacenamiento lisosomal (Koc et al., 1999) y en la enfermedad trasplante contra huésped (Le Blanc & Ringden, 2006).

Actualmente (agosto 2019) existen 1052 estudios clínicos registrados en la web del NIH (<http://clinicaltrials.gov>) en los que se usan células mesenquimales (operador “mesenchymal cell”). En 395 de ellos se utilizan MSC obtenidas de médula ósea (operador “bone marrow derived mesenchymal cell”). Entre las enfermedades más estudiadas se encuentran patología del SNC, enfermedades del colágeno, enfermedades del aparato digestivo, enfermedades de corazón, enfermedades del sistema inmunitario, isquemia, enfermedades articulares, enfermedades musculo-esqueléticas y enfermedades reumáticas.

Existen 29 estudios sobre el uso de MSC para tratar distintas formas de EM (operadores “multiple sclerosis” and “mesenchymal cell”). En 15 estudios emplean MSC obtenidas de la médula ósea (operadores “multiple sclerosis” and “bone marrow derived mesenchymal cell”). De éstos, 11 de ellos actualmente se encuentran en estado finalizado, 2 activos y 2 en período de inclusión. En cuanto al área geográfica que más apuesta por esta terapia, observamos que 7 de éstos estudios se están o se han desarrollado en Europa (3 en España), 3 en EE.UU. y 4 en Oriente Medio. Todos ellos son estudios en fase I/II para evaluar la viabilidad y la toxicidad del trasplante, al tiempo que se estudia la eficacia de dicha terapia y 7 tienen un diseño randomizado, cruzado con cuádruple ciego. En 8 de ellos las células se administran de forma intravenosa, en 4 se realizan inyecciones intratecales y en 3 se comparan ambas vías de administración. El número de células trasplantadas varía de 1 a 2 millones de células / kg.

En la Primera Conferencia de Consenso en Trasplante de Médula Ósea en Pacientes con EM celebrada en 1998 en Milán, se aprobaron los criterios para la selección de pacientes, los procedimientos del trasplante para maximizar la eficacia y se estandarizó la evaluación de los resultados del trasplante (Comi et al., 2000). En general, los criterios de inclusión son pacientes

de entre 18 y 50 años, afectados de RR-EM o SP-EM, con una puntuación en la escala EDSS de 3.5-6.5 y que presenten progresión de enfermedad pese al tratamiento inmunomodulador. Posteriormente, se publicó la guía para la utilización de MSC en EM por el Grupo de Estudio de Trasplante de MSC, en el que se indican los procedimientos para cultivo de las células y el tratamiento de pacientes (Freedman et al., 2010).

En el primer ensayo clínico registrado con estas características se inyectaron intratecalmente MSC autólogas a 10 pacientes con EM que no respondían a tratamientos modificadores de la enfermedad inclusive mitoxantrona. En los resultados obtenidos se describe una paralización, incluso mejora de la progresión de la enfermedad en términos de puntuación EDSS y en número y tamaño de placas de desmielinización, por lo que concluyen que la administración intratecal es un método seguro (Bonab et al., 2012).

Posteriormente otros estudios confirmaron la ausencia de efectos adversos durante 2 años de seguimiento tras el trasplante, evidenciando una disminución de la tasa de proliferación de linfocitos y activación de células dendríticas incluso unas horas después del trasplante (Karussis et al., 2010; Yamout et al., 2010).

En otro estudio se introducen MSC de forma intravenosa en pacientes con EM progresiva, se describe un 10% de reacciones de hipersensibilidad tipo I (prurito, rash, fiebre), pero con una baja tasa de reacciones adversas irreversibles, por lo que igualmente puede considerarse como una terapia segura para pacientes con una esperanza de vida elevada. Además existen cambios estructurales y funcionales (mejora de la función visual y disminución de la progresión de la discapacidad) posiblemente debidos a mecanismos de neuroprotección (Connick et al., 2012) y se evidencia un descenso en la proporción de IFN- γ , de IL17 y del ratio TH1/Th17 ligados al proceso activo de la enfermedad (Llufriu et al., 2014).

6.5.- VÍAS DE ADMINISTRACIÓN.

En la EM las lesiones son multifocales y muchas veces son difusas, por lo que una terapia de reemplazo celular tiene el inconveniente de requerir múltiples intervenciones intratecales. Su principal ventaja es que permite dirigir con precisión el trasplante en la lesión, al tiempo que maximiza la concentración de factores tróficos liberados por las MSC en el lugar deseado. Mediante esta técnica también se promueven interacciones entre las MSC con otros tipos celulares locales, procesos de fusión y transdiferenciación, pero tiene como inconvenientes la rotura de la barrera hematoencefálica, irritación meníngea, hemorragia y edema el lugar trasplantado. Además, existe el riesgo de provocar una embolia ventricular con hidrocefalia secundaria. Por otro lado existen áreas del SNC de difícil acceso y realizar múltiples inyecciones en los diversos focos de lesión puede suponer un riesgo incrementado (Karussis et al., 2010).

Por eso, la mayoría de estudios clínicos opta por la infusión intravenosa de MSC. Esta técnica no lesiona el parénquima nervioso, pero el tamaño relativamente grande de las MSC en suspensión ($23.6 \pm 0.7 \mu\text{m}$ de diámetro vs las $7 \mu\text{m}$ de diámetro capilar) incrementan el riesgo de émbolos e isquemia (Toma et al., 2009). Además tras su infusión vía intravenosa, la mayoría de MSC se retienen en la circulación precapilar pulmonar, por lo que el número de células disponibles que se dirigen al tejido diana queda considerablemente reducido respecto al número de células infundidas (Gao et al., 2001). Pese a esto, las células atrapadas en pulmón pueden ejercer efectos paracrinosis a distancia aumentando reparación de corazón, SNC y otros tejidos mediante la liberación de TSG-6, TGF- β , HGF, IL4, IL10, PGE2 (Lee et al., 2009).

Las MSC se adhieren al endotelio capilar vía selectinas y moléculas de adhesión pudiendo migrar transendotelialmente de forma similar a los leucocitos. Para ello secretan metaloproteasas de matriz y deforman su membrana para el trasvase (Steingen et al., 2008). En el SNC este proceso está dificultado por la existencia de la BHE, que de forma paradójicamente ventajosa únicamente se interrumpe en las placas de lesión inflamatoria aguda donde además, las MSC pueden verse atraídas por mecanismos quimiotácticos (Figura I20).

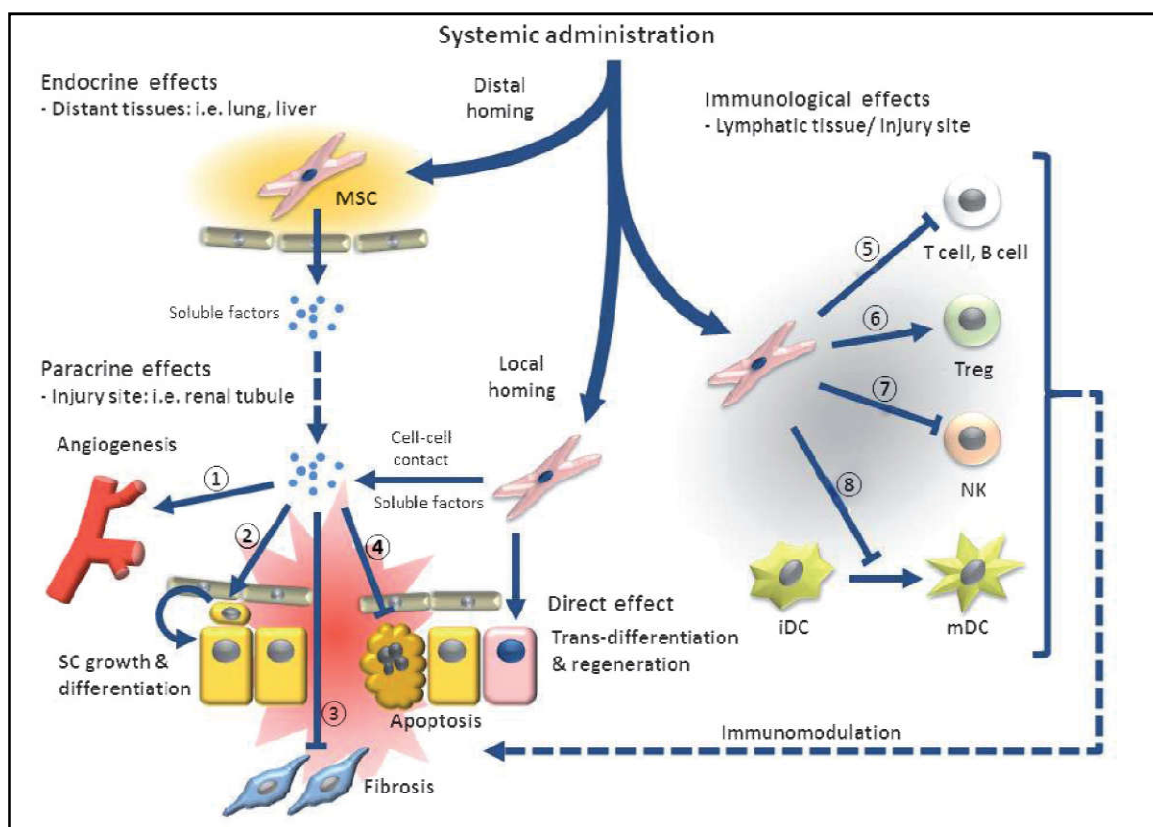


Figura I20: Efectos de la administración sistémica de MSC.

La administración sistémica de MSC puede ejercer efectos endocrinos a larga distancia, paracrinosis localmente o acciones mediadas por contacto celular.

1: efecto angiogénico; 2: estimulador del crecimiento y diferenciación de células progenitoras; 3: inhibición de la fibrosis; 4: inhibición de la apoptosis; 5: supresión de células T y B; 6: inducción, diferenciación y expansión de linfocitos T reguladores; 7: Inhibición de linfocitos NK; 8: inhibición de la maduración de células dendríticas. Ver tabla 14. (Figuroa et al., 2012).

7.- FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS.

Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), son una familia proteica soluble con 18 formas moleculares descritas que presentan distinta afinidad de unión a su receptor, una característica dependiente del editado alternativo que acontece en el transcrito original. Esta familia de factores tróficos posee cuatro receptores transmembrana de tipo tirosin-kinasa, que a través de una cascada de señalización Ras-ERK MAPK, o PI3K-AKT, promueven proliferación, supervivencia y migración de oligodendrocitos. Estas señales se limitan en tiempo y espacio por medio de la expresión de Sprouty (revisado en Beenken & Mohammadi, 2009).

En particular, el FGF8 está implicado en la formación del cerebro y rombencéfalo (Crossley et al., 1996; Martínez et al., 1999; Lee et al., 1999; Xu et al., 2000) y prosoencéfalo (Storm et al., 2006). Además, mutaciones en el gen de FGF8 produce graves alteraciones en la formación de los primordios mesencefálicos y cerebelosos (Crossley & Martin, 1995), del tálamo y telencéfalo (Martínez-Ferre & Martínez, 2009). Además, también está implicado en procesos de migración radial de progenitores neurales durante el desarrollo desde la SVZ a la placa cortical (Smith et al., 2006). Por otro lado, el FGF8 es necesario para la obtención in vitro de neuronas dopaminérgicas, por lo que podría estar implicado en enfermedades como el Parkinson (Parmar & Li, 2007).

Sin embargo, pese a la gran variedad de estudios que implican el FGF2 en el proceso de supervivencia, proliferación y diferenciación de oligodendrocitos (ver apartado 4.4 de introducción), se conoce poco en cuanto a la implicación de FGF8 durante el proceso de reparación de las lesiones desmielinizantes, aun teniendo una estructura molecular similar.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

La hipótesis general de este trabajo plantea que las células mesenquimales procedentes de médula ósea son capaces de estimular, mediante la liberación de moléculas que componen su secretoma, los nichos neurogénicos del sistema nervioso central crónicamente desmielinizado, generando precursores con capacidad de migrar, diferenciarse a oligodendrocitos maduros y remielinizar los axones periféricos al trasplante con una eficiencia mayor a otros tipos celulares.

Las hipótesis específicas serían las siguientes:

- El trasplante de células mesenquimales derivadas de médula ósea estimula nichos neurogénicos y posee efectos quimioatrayentes sobre los progenitores generados en ellos.
- Los progenitores atraídos desde los nichos neurogénicos describen una ruta migratoria caudal hacia el lugar del trasplante que debe ser histológicamente identificable.
- El trasplante de células mesenquimales derivado de médula ósea estimula la diferenciación de progenitores de oligodendrocitos a células con capacidad de sintetizar vainas de mielina.
- Las nuevas vainas de mielina que han remielinizado los axones deben de restablecer la velocidad de transmisión del impulso nervioso y ser cuantitativamente demostrable.
- Las células mesenquimales derivadas de médula ósea deben liberar factores tróficos con capacidad de llevar a cabo todo el programa oligodendrogénico por sí mismo.
- Las células mesenquimales derivadas de médula ósea son capaces de sobrevivir en el parénquima nervioso el tiempo suficiente para promover la remielinización y deben carecer de potencialidad neoplásica para que sean adecuadas para su uso terapéutico.

OBJETIVOS

En este trabajo se estudia el potencial remielinizante de las células mesenquimales procedentes de médula ósea cuando son trasplantadas intraparenquimalmente en la fimbria de ratones desmielinizados crónicamente con cuprizona. Estas propiedades se van a comparar con la obtenida con otros grupos celulares con potencialidad para ser utilizados en terapia celular, como son las células del ligamento periodontal y pulpa dental humanas, así como con una línea de oligodendrocitos maduros inmortalizados 158N. Para ello, los objetivos concretos que se plantearon son los siguientes:

- Generar ratones crónicamente desmielinizados como modelo de placas de desmielinización crónica en esclerosis múltiple y analizar los patrones de desmielinización generados.
- Puesta a punto de los métodos microquirúrgicos para intervenir la fimbria del hipocampo, realizar en ella el trasplante de células y comprobar la viabilidad de las mismas 90 días tras la cirugía.
- Analizar y cuantificar histológicamente los progenitores de oligodendrocitos, la reacción glial y la formación de mielina que se genera en la periferia de los trasplantes celulares.
- Analizar y cuantificar los factores tróficos implicados en el programa oligodendrogénico que son sintetizados y liberados por las células mesenquimales derivadas de médula ósea, tanto en cultivo como una vez trasplantadas en la fimbria.
- Analizar la activación de los nichos neurogénicos y localizar las posibles rutas migratorias hacia el lugar del trasplante.
- Analizar la funcionalidad de los axones remielinizados mediante estudios electrofisiológicos.
- Analizar y cuantificar la actividad e implicación del FGF8 en el programa *oligodendrogénico per se* y su síntesis y liberación por las células mesenquimales, tanto en cultivo como una vez trasplantadas en la fimbria.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- LÍNEAS GENERALES.

Este trabajo se divide en cuatro secciones donde se estudia el potencial remielinizante de cuatro tipos celulares y de un factor trófico purificado que se trasplantaron intraparenquimalmente en la fimbria de ratones desmielinizados crónicamente con cuprizona: células mesenquimales (MSCs), oligodendrocitos inmortalizados de la línea 158N, células mesenquimales del ligamento (hPOL-SC) y pulpa dental humana (hDP-SC) e implantes de bolas de heparina embebidas con FGF8 para estudiar el papel que ejerce dicho factor en el proceso de remielinización *per-se*.

Las MSCs, las células 158N y las bolas de heparina embebidas en FGF8, se trasplantaron en ratones con desmielinización crónica de la línea C3H/He, mientras que las células madre de la pulpa y ligamento periodontal humanas, se trasplantaron en ratones inmunodeprimidos (*nude*) para evitar el rechazo inmunológico frente al trasplante, desmielinizados con el mismo protocolo.

1.1.- CRONOGRAMA.

El tratamiento desmielinizante con Cuprizona 0.2% (w/w) se inició cuando los ratones alcanzaron el primer mes de vida y se continuó con el tratamiento *ad libitum* durante 12 semanas para conseguir un estado de desmielinización crónico previo al trasplante. Posteriormente se realizaron los procedimientos quirúrgicos propios de cada grupo experimental y se mantuvieron en observación sin tratamiento desmielinizante durante 12 semanas más. Tras este período de recuperación se procedió a la obtención de muestras (Figura M1).

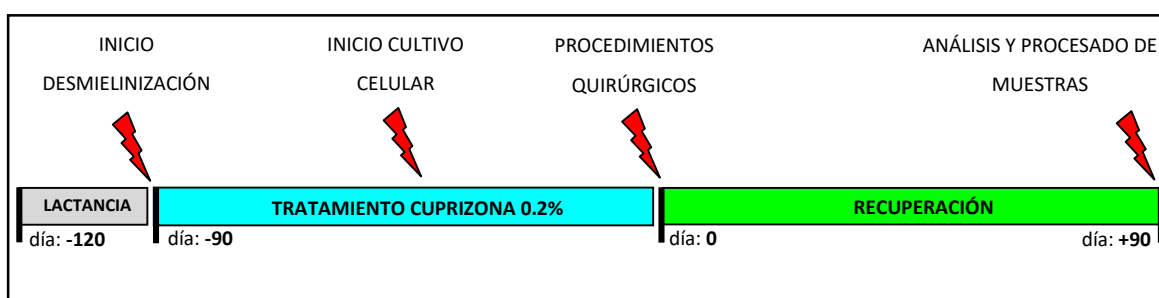


Figura M1: Cronograma del protocolo experimental. El día del inicio de cultivo es variable según el tipo celular del que se trate (ver más adelante).

1.2.- GRUPOS EXPERIMENTALES.

En cada una de las cuatro secciones experimentales se diseñaron los siguientes grupos:

A) Grupo Trasplantado con células: Según el grupo experimental se trasplantaron MSCs, células 158N, células madre del ligamento periodontal (hPOL-SCs), células madre de la pulpa

dental humanas (hDP-SCs) o bolas embebidas con FGF8 (bFGF8). El lugar trasplantado fue la fimbria derecha en las coordenadas que se detallan más adelante.

B) Grupo Operado Sham: en este grupo se realiza la misma cirugía sobre la fimbria derecha, pero solo se inyecta solución vehículo (DMEM) sobre la que se resuspendieron las células o PBS en el caso de las bolas de heparina (bPBS).

C) Grupo Control: Se trata de las fimbrias izquierdas de cada ratón operado. La fimbria izquierda no ha sido manipulada quirúrgicamente pero ha recibido el mismo tratamiento desmielinizante que la operada (derecha). Al comparar las fimbrias bilateralmente dentro de un mismo sujeto se evita la variabilidad interindividual frente al tratamiento y permite evaluar si el tratamiento desmielinizante crónico se ha sido efectivo. En la puesta a punto del experimento, la determinación de su eficacia y reproducibilidad en el grado de desmielinización, se comprobó que no existen diferencias en el grado de desmielinización entre la fimbria derecha e izquierda de los 10 ratones tratados, y que las dos estaban totalmente desmielinizadas tras el tratamiento.

D) Grupo Normal: Corresponde a ratones de la cepa correspondiente con 210 días de edad en condiciones normales, que no han sido desmielinizados ni tratados quirúrgicamente.

En la Tabla M1 se detallan las secciones y grupos experimentales con el número de ratones utilizados y su distribución analítica.

2.- MUESTRAS HUMANAS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

2.1.- RATONES.

Los ratones de la especie *Mus musculus* y cepa C57Bl se mantuvieron en las instalaciones del Campus de San Juan de la UMH. Los experimentos se realizaron conforme las leyes Europeas y Españolas del cuidado animal en experimentación (Consejo Directivo 86/609/EEC), fueron analizados y aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández e Instituto de Neurociencias de Alicante. Se tomaron todas las precauciones posibles para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento.

2.1.1.- DONANTES DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE LA MÉDULA ÓSEA.

Se utilizaron dos cepas de ratones según el experimento a realizar:

TRASPLANTE	GRUPO EXPERIMENTAL	Nº de ratones	DISTRIBUCIÓN
MSC β ACT-GFP	OPERADO MSC	36	10 Inmunofluorescencia
			4 Inmunohistoquímica
			5 PCR cuantitativa
			8 Electrofisiología
			6 Ultraestructura
	3 Viabilidad		
	OPERADO SHAM	16	4 Inmunofluorescencia
			3 Inmunohistoquímica
			3 PCR cuantitativa
			3 Electrofisiología
			3 Ultraestructura
	CONTROL	52	14 Inmunofluorescencia
			7 Inmunohistoquímica
			8 PCR cuantitativa
			11 Electrofisiología
9 Ultraestructura			
3 Viabilidad			
MSC p1p/DM20	OPERADO MSC	4	Inmunofluorescencia
	OPERADO SHAM	4	
	CONTROL	8	
OLIGOS. INMORT. 158N	OPERADO 158N	4	Inmunofluorescencia
	OPERADO SHAM	4	
	CONTROL	8	
CÉLS. MESENQ U LIG. PERIDNT HUM.	OPERADO hPOL-SCs	4	Inmunofluorescencia
	OPERADO SHAM	4	
	CONTROL	8	
CÉLS. MESENQ PULPA DENTAL HUM.	OPERADO hDP-SCs	4	Inmunofluorescencia
	OPERADO SHAM	4	
	CONTROL	8	
BOLAS DE HEPARIN.	IMPLANTADO bFGF8	4	Inmunofluorescencia
	IMPLANTADO bPBS	4	
	CONTROL	8	
NORMAL		19	3 Inmunofluorescencia
			3 Inmunohistoquímica
			3 PCR cuantitativa
			7 Electrofisiología
			3 Ultraestructura

Tabla M1: Esquema de las secciones y grupos experimentales.

A) Ratones transgénicos C57Bl/6-Tag (ACT β -EGFP)1Osb/J. Estos ratones expresan en todas sus células y de forma constitutiva la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor de β -actina de pollo (Okabe et al., 1997). Esta cepa, a su vez, presenta el complejo mayor de histocompatibilidad H2D^b.

B) Ratones transgénicos plp-GFP que expresan la proteína verde fluorescente bajo el promotor plp/dm20 de la proteína proteolipídica mayoritaria de mielina (colonia proporcionada por el laboratorio del Dr. B. Zalc).

2.1.2.- LÍNEA CELULAR 158N DE OLIGODENDROCITOS INMORTALIZADOS.

Se trata de una línea de oligodendrocitos obtenidos a partir de cultivos de hemisferios cerebrales de ratones neonatos de la cepa B6CBA (Feutz et al., 2001). La immortalización de la línea se consiguió mediante la introducción del plásmido pMT_{wt}SVneo. Éste plásmido incluye el gen del antígeno SV40-T regulado por el promotor de la metaloproteína-I. Además, el plásmido lleva el gen de resistencia a la neomicina G418 como método de selección de las células transfectadas. Esta línea celular fue proporcionada por el Dr. M. Said. Ghaundour.

2.1.3.- RATONES RECEPTORES DEL TRASPLANTE DE CÉLULAS MURINAS.

Las MSCs, los oligodendrocitos immortalizados 158N y bolas de heparina se trasplantaron en ratones de la cepa SwissC3H/He. Esta cepa posee un complejo mayor de histocompatibilidad H-2 (H2K^k) diferente al que poseen las células mencionadas, cuyo haplotipo es H2D^b. Esto supone una alternativa al GFP en la inmunodetección y diferenciación de las células trasplantadas frente a las células del huésped.

2.1.4.- RATONES RECEPTORES DE CÉLULAS HUMANAS.

Las células humanas se trasplantaron en ratones inmunodeprimidos Hsd (Athimic Nude-Foxn1 nu/nu; Harlan Laboratories Models, S.L.). Estos ratones carecen de timo y por tanto poseen un sistema inmune deficiente en linfocitos T, responsables de la inmunidad celular. La carencia de estas células disminuye el riesgo de rechazo del trasplante de células humanas. Sin embargo, son ratones más propensos a las infecciones, por lo que se mantuvieron en boxes aislados acondicionados para evitarlas.

2.2.- MUESTRAS HUMANAS.

Estas células proceden de estudios previos realizados en nuestro laboratorio. Los pacientes proceden de los Servicios de Cirugía Maxilofacial del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia), del Hospital de San Juan de Alicante y de la Unidad de Salud Bucodental del Centro de

Salud de Molina de Segura “Jesús Marín” (Murcia) que donaron las piezas dentales tras ser extraídas por otros motivos clínico-patológicos. Los pacientes fueron convenientemente informados sobre el destino de las muestras y firmaron el correspondiente consentimiento informado.

2.2.1.- CÉLULAS MESENQUIMALES DE LA PULPA DENTAL HUMANAS (HDP-SCS).

Estas células fueron aisladas, transfectadas y caracterizadas en nuestro laboratorio por el Dr. Rodríguez-Lozano y el Dr. Bueno (Rodríguez-Lozano, 2009).

Esta línea celular procede del tercer molar carente de caries de pacientes de entre 18 y 30 años extraídos por mal posición dentaria. Tras la purificación y expansión de las hDP-SCs se transfectaron mediante electroporación con el plásmido de DNA CMV-eGFP-ires-higromicina. La selección de las células transfectadas se realizó con higromicina B. Tras la selección, se comprobó que el 100% de las células obtenidas expresaban la proteína verde fluorescente.

2.2.2.- CÉLULAS MESENQUIMALES DEL LIGAMENTO PERIDONTAL HUMANO (HPOL-SCS).

Estas células fueron aisladas, transfectadas y caracterizadas en nuestro laboratorio por la Dra. Ramírez y el Dr. Bueno (Bueno et al., 2012).

Esta línea celular procede del tercio medio de la superficie de los premolares de pacientes a los que se les extrajo las piezas durante la realización de una ortodoncia. Tras su purificación y expansión las células se transfectaron con el mismo plásmido descrito en el apartado anterior y se seleccionaron igualmente en higromicina B. Finalmente se comprobó la expresión intrínseca de la proteína verde fluorescente en los cultivos obtenidos.

3.-TRATAMIENTO DESMIELINIZANTE.

Para conseguir una desmielinización crónica de las fibras nerviosas del sistema nervioso central, los ratones receptores del trasplante se alimentaron *ad libitum* con comida mezclada con un 0.2% (w/w) de Cuprizona (bis-cyclohexylidenehidracida oxálico). El tratamiento se inició cuando los ratones alcanzaron la cuarta semana de vida y se mantuvo durante 12 semanas sin interrupción. De este modo se consigue un estado de desmielinización crónica en la que se ve afectada la capacidad de los progenitores de los oligodendrocitos a diferenciarse a células productoras de mielina (Armstrong et al., 2006). Por este motivo las lesiones desmielinizantes obtenidas se asemejan a las observadas en las placas de desmielinización crónica de la esclerosis múltiple.

Bajo este tratamiento los ratones pierden peso progresivamente desde el inicio del tratamiento y presentan signos visibles de deterioro. Por este motivo, se incluyó azúcar de caña en los pellets de comida para aumentar el contenido calórico de la dieta a la vez que potenciarla dependencia a la comida tratada, evitando así el rechazo durante los primeros días de cambio de dieta.

Esta modificación del método mejora el aspecto físico y la calidad de vida de los ratones. Además, la densidad de la disolución azucarada permite la resuspensión de la cuprizona en polvo para su posterior absorción homogénea en los pellets. Para ello se realizó el siguiente protocolo:

Cuprizona.	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.	0.2 % (w/w)
Azúcar de caña.	Azucarera Ebro, S.L. Sociedad Unipersonal. España.	8.0 % (w/w)
Agua corriente.	Red de agua potable de Alicante.	24.0 % (w/v)

Se mezcló previamente 40 gr de azúcar de caña con 1 gr de cuprizona hasta su completa homogenización. Posteriormente se añadió 120 ml de agua corriente y se mezcló suavemente hasta obtener una melaza homogénea. La melaza se mezcló con 500 gr de pellets desecados en un bote redondo de forma continua y lenta mediante agitación radial y giratoria en roller hasta la completa absorción de la melaza.

Una vez se reabsorbió la melaza, se sacaron con cuidado los pellets embebidos y se esparcieron en monocapa en una bandeja. Se dejaron secar en horno a 60°C durante 8 horas removiéndolos cada hora para conseguir un secado homogéneo.

Finalmente se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de administrárselo a los ratones. La elaboración de la comida se llevó a cabo semanalmente durante las 12 semanas que duró el tratamiento.

4.-AISLAMIENTO Y ESTUDIO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.

4.1.- CULTIVOS PRIMARIOS.

Se anestesiaron y sacrificaron ratones de la cepa donantes transgénicos β -actina/GFP o plp/GFP de 6 a 8 semanas de edad mediante dislocación cervical. Se extrajeron los fémures y posteriormente la médula ósea mediante lavado intramedular con Medio de Eagle modificado por Dulbecco con 4500 mg/l de glucosa (D-MEM Glutamax; Invitrogen Lives Technologies),

obteniendo una suspensión de células individualizadas mediante disociación mecánica. Se lavaron y centrifugaron 5 minutos a 1100 rpm.

El pellet obtenido se resuspendió en D-MEM suplementado con 15% suero bovino fetal (Biochrom), 100 U/ml penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich), 1 mM piruvato sódico, 1% aminoácidos no esenciales, y 1 ng/ml Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2 (FGF2) (Sigma-Aldrich). La suspensión celular obtenida se plaqueó en un frasco de cultivo de 25 cm² y se mantuvo en incubadora 37°C con un 5% CO₂.

Durante 3-4 semanas se seleccionó la población celular con capacidad de adherencia al plástico desechando las células no adheridas. Se realizaron dos cambios de medio por semana.

Antes de que el cultivo alcanzara la confluencia del frasco (aproximadamente cada 5-7 días), las células se separaron de la placa mediante digestión con tripsina/EDTA 0.25% (Sigma-Aldrich) y se resembraron en un frasco de cultivo de 75 cm². Tras 4 semanas (pases 2-3) se obtuvo un cultivo puro de células madre mesenquimales siendo éste el momento adecuado para realizar los trasplantes.

4.2.- ESTUDIO DE MARCADORES MESENQUIMALES.

En cada trasplante realizado se destinaron 40.000 células para su caracterización mediante inmunomarcaje de antígenos mesenquimales y células madre hematopoyéticas. Para ello se resembraron 10.000 células/pocillo (4 pocillos) resuspendidas en 500 µl de medio de cultivo.

Las células se adhirieron a la placa dejándolas en incubación durante 48 horas a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente se lavaron 3 veces durante 3 minutos con medio de cultivo fresco y se fijaron durante 10 minutos con paraformaldehído (PFA) al 4% (Sigma-Aldrich) en tampón fosfato (PB) 0.1 M, pH 7.4 (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con tampón fosfato salino (PBS) 0.1 M, pH 7.4 (Sigma-Aldrich) y se realizó un bloqueo de uniones inespecíficas mediante PBS con 1% de suero de caballo (Biochrom) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Todas las diluciones de anticuerpo primario, secundario y estreptavidina-fluoróforo que se detallan a continuación, se centrifugaron 5 minutos a 10000 rpm para precipitar agregados. Las soluciones de bloqueo y lavado se filtraron previamente con filtro de 0.22 µm.

Se añadió el anticuerpo primario diluido en PBS 1% suero bovino fetal: Ig rata anti-ratón CD44 (1:500; BD Biosciences); Ig rata anti-ratón CD90 (1:250; BD Biosciences); Ig rata anti-ratón CD34 (1:500; BD Biosciences); Ig rata anti-ratón CD45/B220 (1:500; BD Biosciences). La incubación se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C. Tras ella se realizaron tres lavados durante 3 minutos

con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario Ig biotinilada de cabra anti-rata IgG (1:200; Vector Laboratories) diluido en PBS 1% suero de caballo durante 2 horas a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS y se reveló con Texas red-estreptavidina que emite fluorescencia roja al iluminar con luz polarizada de 594 nm (1:500; Vector Laboratories) en PBS con 0.1 gr de albúmina de suero bovino durante 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad.

Cinco minutos antes de finalizar la incubación, se realizó un marcaje nuclear con 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI. 2 µg/ml de PBS 1x; Molecular Probes) que se intercala específicamente entre las bases de DNA de doble cadena emitiendo fluorescencia azul tras iluminar la muestra con luz polarizada ultravioleta. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS y se tomaron fotografías con un microscopio invertido de fluorescencia (Leica DMR).

En todos los trasplantes realizados, el 100% de las células testadas expresaban el antígeno CD90 y CD44 y no expresaban CD34 y CD45, confirmando que la población celular obtenida está exclusivamente compuesta de MSCs (Figura M2).

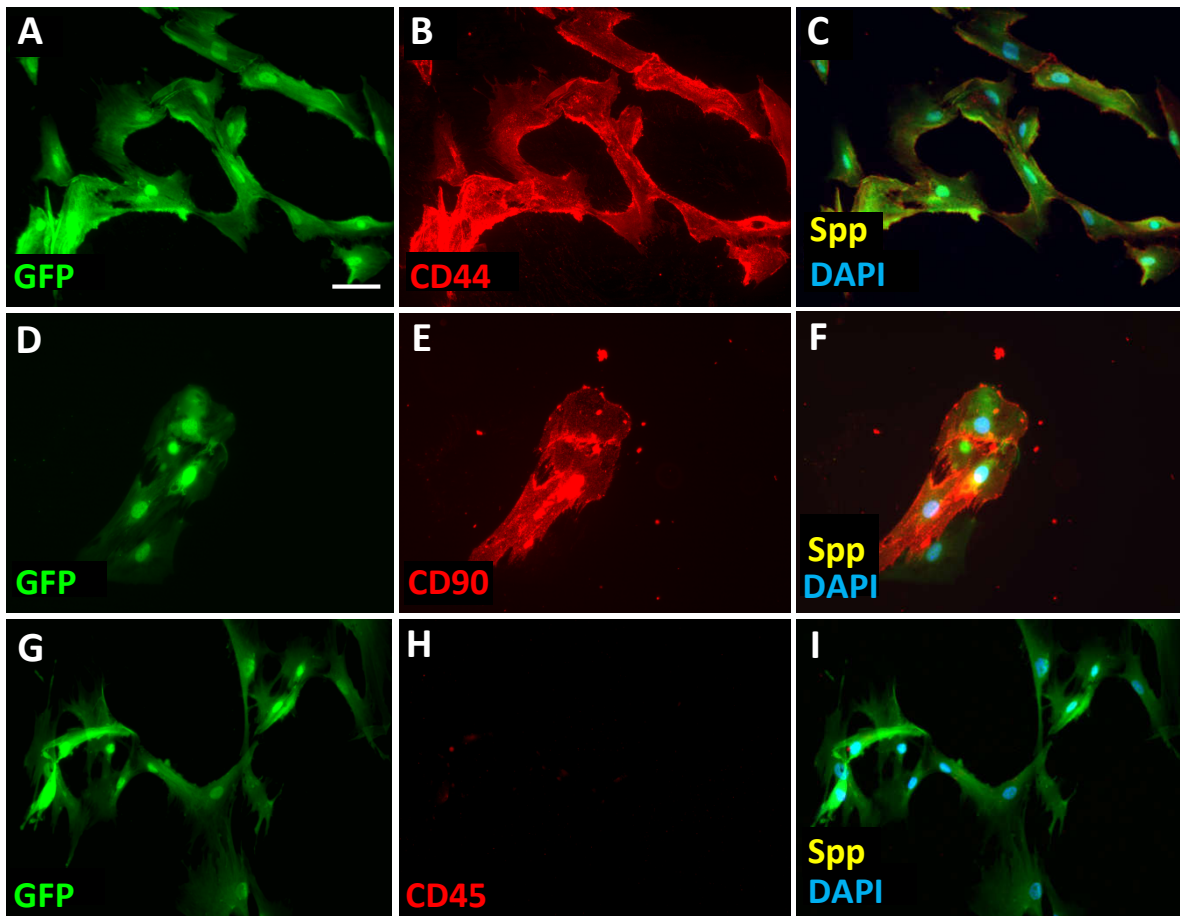


Figura M2: Estudio fenotípico de las MSCs trasplantadas.

Todos los trasplantes se realizaron con una población 100% mesenquimal, caracterizada por poseer los antígenos de membrana CD44 (A-C), CD90 (D-F) y carecer de los antígenos de membrana CD45 (G-I) y CD34 (imagen no mostrada).

4.3.- EXPRESIÓN DE FGF8.

Se realizó un inmunomarcaje para confirmar la síntesis del factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF8) en las MSCs trasplantadas. Para ello se sembraron por separado 10.000 células procedentes de 6 animales diferentes en 6 pocillos resuspendidas en 500 µl de medio de cultivo.

Las células se adhirieron a la placa incubándolas durante 48 horas a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente se lavaron 3 veces durante 3 minutos añadiendo medio de cultivo y se fijaron 10 minutos con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1M, pH 7.4 a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS y se realizó un bloqueo de uniones inespecíficas y permeabilización de la membrana plasmática mediante PBS con 1% de suero de caballo (Biochrom) y 0.1% tritón X-100 (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Todas las diluciones de anticuerpo primario, secundario y estreptavidina-fluoróforo que se detallan a continuación, se centrifugaron 5 minutos a 10000 rpm para precipitar agregados. Las soluciones de bloqueo y lavado se filtraron con filtro de 0.22 µm.

Posteriormente se añadió el anticuerpo primario Ig ratón anti-Factor de Crecimiento Fibroblástico 8 (25 µg/ml; R&D Systems) diluido en PBS con 1% suero de caballo y 0.1% tritón X-100. La incubación se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C. Tras ella, se realizaron tres lavados durante 3 minutos con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario Ig biotinilada de cabra anti-rata IgG (1:200; Vector Laboratories) diluido en PBS 1% suero de caballo durante 2 horas a temperatura ambiente y oscuridad.

Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS y se reveló con Texas red-estreptavidina que emite fluorescencia roja al iluminar con luz polarizada de 594 nm (1:500; Vector Laboratories) en PBS con 0.1 gr de albúmina de suero bovino durante 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad.

Cinco minutos antes de finalizar la incubación, se realizó un marcaje nuclear con 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI. 2µg/ml de PBS 1x; Molecular Probes) que se intercala específicamente al DNA nuclear emitiendo fluorescencia azul tras iluminar la muestra con luz polarizada ultravioleta. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS y se tomaron fotografías con un microscopio invertido de fluorescencia.

4.4.- ESTUDIO DE SENESCENCIA CELULAR.

Tras sucesivos pases en cultivo las líneas celulares no inmortalizadas comienzan a entrar en un estado de quiescencia donde se reduce la tasa de proliferación celular denominado "senescencia celular". Para confirmar que las MSCs trasplantadas no han alcanzado este estado tras los 4

pases en cultivo previos a la cirugía, se realizaron tinciones CD44 y CD90 junto a actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (Figura M3).

Para ello, se sembraron por separado 10.000 MSCs procedentes de 6 animales diferentes en 12 pocillos (2 pocillos por cada muestra) resuspendidas en 500 μ l de medio de cultivo. Las células se adhirieron a la placa incubándolas durante 48 horas a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente se lavaron 1 vez con medio de cultivo a 37°C y 2 veces con PBS a 37°C durante 3 minutos. Se fijaron 10 minutos con glutaraldehído 0.5% en PBS 0.1 M, pH 7.4 a temperatura ambiente. Al finalizar la fijación se lavó tres veces con PBS durante 3 minutos.

4.4.1.- REACCIÓN β -GALACTOSIDASA ASOCIADA A SENESCENCIA.

La reacción se llevó a cabo incubando las células con la solución de tinción durante 12 horas en oscuridad y 37°C. La solución de tinción se compone de ferrocianuro potásico (100 mM), ferricianuro potásico (100 mM), NaCl (5 M), MgCl₂ (1 M), X-Gal (20 mg/ml). Todo ello en tampón cítrico-fosfato (ácido cítrico 0.1 M y Na₂HPO₄ 0.2 M). Tras la incubación se realizaron tres lavados con agua destilada durante tres minutos (Dimri et al., 1995).

4.4.2.- INMUNOCITOQUÍMICA.

Posteriormente se realizó una tinción control de CD44 o CD90 en uno de los dos pocillos por animal. Previamente se realizó un bloqueo de uniones inespecíficas mediante PBS con 1% de suero de caballo durante 30 minutos a temperatura ambiente y se añadió el anticuerpo primario diluido en PBS 1% suero bovino fetal: Ig rata anti-ratón CD44 (1:500; BD Biosciences); Ig rata anti-ratón CD90 (1:250; BD Biosciences). La incubación se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C.

Tras ella se realizaron tres lavados durante 3 minutos con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario Ig biotinilado de cabra anti-rata IgG (1:200. Vector Laboratories) diluido en PBS 1% suero de caballo durante 2 horas a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS y se amplificó el marcaje durante 2 horas a temperatura ambiente con el complejo conjugado peroxidasa-estreptavidina en PBS 1x (1:500; ABC Elite Kit) que fue preparado una hora antes (1:1).

Tras éste, se realizaron tres lavados de 15 minutos: los dos primeros con PBS 1x, el último con tampón salino Tris-HCl 0.05M (1x), pH 7.5. El revelado se realizó tras una preincubación con una dilución filtrada de 3,3'-diaminobenzidina (DAB 1%; Applichem) en Tris-HCl durante 10 minutos. Posteriormente se añadió DAB-TBS con peróxido de hidrógeno al 0.03% filtrado. La reacción se siguió durante 4 minutos y se paró con varios lavados de TBS 0.05 M. Tanto la preincubación

como la incubación se realizaron en oscuridad. Las células se observaron y fotografiaron con un microscopio invertido (Leica DMR, Leica Microsystems).

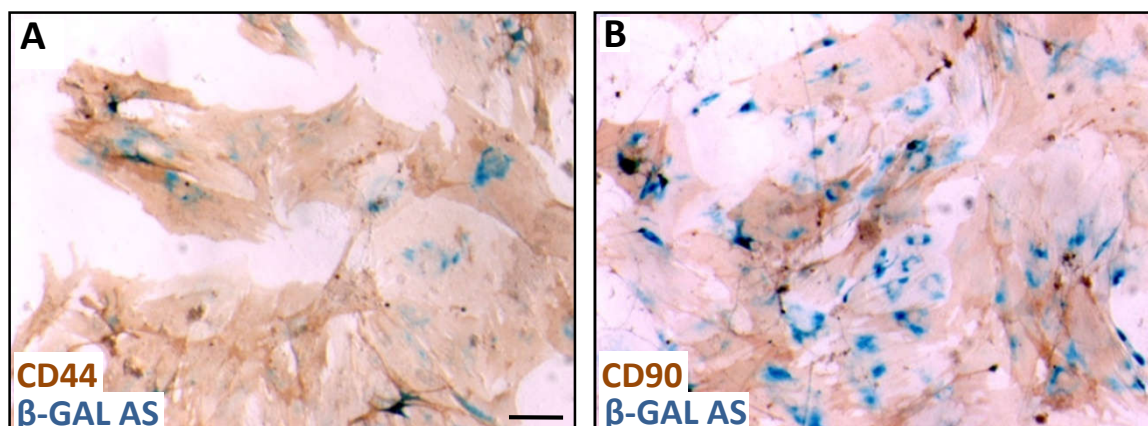


Figura M3: Reacción β -Galactosidasa asociada a senescencia (azul) de las MSCs en el mismo pase en el que se realizaron los trasplantes. El precipitado marrón corresponde a inmunomarcaje con DAB de CD44 (A) y CD90 (B). Escala: 20 μ m.

4.5.- ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS MSCs MEDIANTE PCR.

4.5.1.- LISIS CELULAR Y AISLAMIENTO DEL RNA.

Se analizó la transcripción de genes de factores tróficos implicados en remielinización, entre ellos NT3, NT4/5, PDGF y NTF- β . Para ello se realizaron cuatro cultivos de MSCs procedentes de animales distintos. En el tercer pase las células se levantaron de la placa con tripsina/EDTA al 0.25%, se centrifugaron y se resuspendieron en 1ml + 4ml de PBS 1x. A partir de este punto, el resto de los pasos se realizaron con fungibles y en condiciones libres de RNAsas.

Se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en 200 μ l de PBS. La lisis celular se realizó con 1 ml de trizol realizando varios pases con la punta de pipeta. Se incubó el homogeneizado durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente se añadió 200 μ l de de cloroformo y se agitó con la mano durante 30 segundos. Seguidamente se dejó reposar 3 minutos a temperatura ambiente y se separaron las fases centrifugando 15 minutos a 12000 rpm a 4°C.

Se recogió la fase superior acuosa donde se encuentra el RNA y se descartó el resto. Para precipitar el RNA se añadió 500 μ l de isopropanol, se agitó fuertemente con la mano y se dejó 30 minutos reposando en hielo. Posteriormente se centrifugó 15 minutos a 12000 rpm, a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Para finalizar, se lavó dos veces con 1 ml de etanol 70% preparado con agua-DEPC a -20°C y se centrifugó durante 15 minutos a 12000 rpm. Se eliminó el sobrenadante

y se dejó secar el precipitado al aire y en hielo. Una vez el precipitado se tornó completamente transparente se resuspendió en 20 μ l de H₂O (Sigma).

4.5.2.- CONTROL DE CALIDAD Y PUREZA.

La calidad (no degradación) del RNA extraído se comprobó separando las bandas de RNA ribosomal no degradado realizando una separación de bandas en gel de agarosa al 2% (Roche), en tampón TBE 1x (Tris Base 89 mM; ácido bórico 89 mM; ácido etilendiaminotetraacético EDTA 2 mM) con bromuro de etidio 10 mg/ml. Las muestras (2 μ l RNA) se depositaron en tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0.05%; azul de xilencianol 0.05%; EDTA 0.5 M, pH 8, 100 mM; Glicerol 50%). Se utilizó el patrón de peso molecular XIV (Roche), (Figura M4A).

La pureza y concentración de la muestra se analizó espectrofotométricamente mediante Nanodrop obteniendo una concentración aproximada de 2000 ng de RNA/ μ l. Se consideró como óptima una relación A_{280}/A_{260} superior a 1.91, siendo la A_{260} la que presentan los ácidos nucleicos, que es proporcional a su concentración. La A_{280} es la que presenta el enlace peptídico de las proteínas (Figura M4B).

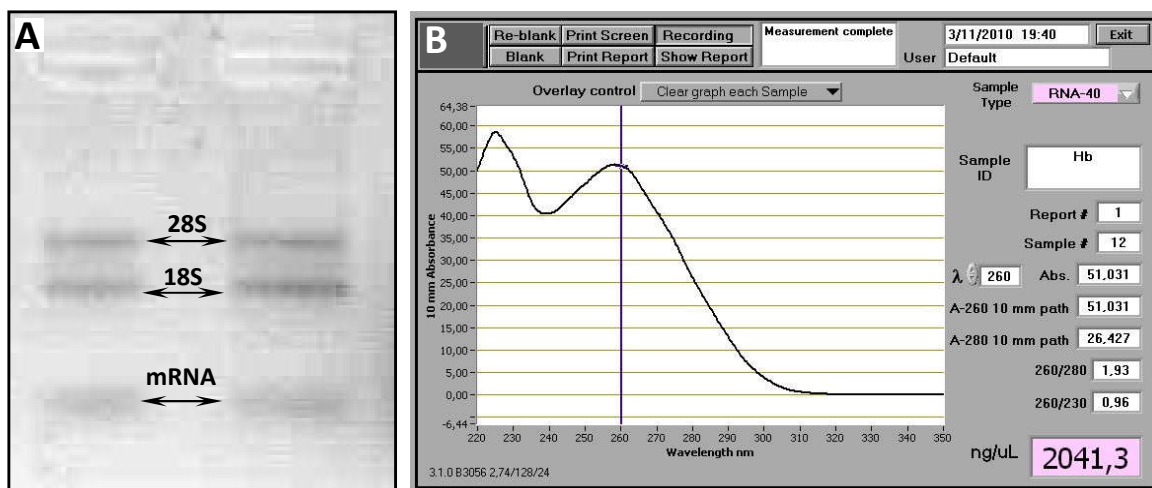


Figura M4: Control de calidad de la extracción de RNA.

(A): Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de RNA de dos cultivos. Pueden observarse las bandas correspondientes al RNA ribosomal 28s y 18s. Más abajo aparece la banda del RNA mensajero más difusa debido a la heterogeneidad de tamaños.

(B): Representación del espectro de absorción de las muestras mediante nanodrop. El programa ofrece directamente la relación A_{260}/A_{280} y la concentración.

4.5.3.- RETROTRANSCRIPCIÓN.

Consiste en transformar el RNA que expresan las MSCs en DNA complementario. Para ello, según la concentración de la muestra, se recogió el volumen suficiente de RNA para tener 1 μ g y

se añadieron 2 μ l de exanucleótidos (20 pmoles; Promega). La mezcla se preincubó a 70°C durante 10 minutos. Se puso en hielo y se dio un spin en centrifuga.

Posteriormente se añadió la mezcla de reacción compuesta de 4 μ l de una mezcla de los 4 desoxinucleótidos tri-fosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP a una concentración de 25 mM cada uno; Takara), 4 μ l de tampón Expand 10X (Roche), 1 μ l de inhibidor de RNAsa ditioneitol (40 U/ μ l; Roche), 2 μ l de transcriptasa reversa AMV (20 U/ μ l; Finnzymes) y se añadió H₂O libre de RNAsas hasta alcanzar un volumen de reacción de 40 μ l. Se removió con pipeta y se incubó 1 hora a 42°C. Tras la reacción se enfrió en hielo, se le dio un pulso en centrifuga y se conservó a -80°C.

4.5.4.- AMPLIFICADO MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Una vez obtenido el cDNA, se comprobó la presencia o ausencia de diversos transcritos de factores tróficos implicados en remielinización. Para ello se utilizaron los cebadores específicos para los exones de los genes de NGF- β , NT4, NT3, GDNF, BDNF, PDGF, FGF2, IGF, EGF. Igualmente se analizó la expresión de los genes controles CD44, CD90 y ciclina. Así mismo, se realizó un control negativo sin cDNA.

Se siguió el siguiente protocolo de PCR multiplex: solución para reacción de PCR MasterMix 2X (12.5 μ l); Q solution 5X (2.5 μ l); mix de cebadores (10 pmol/ μ l) directo (F) y reverso (R) (Ver secuencia en la Tabla T2); 100 ng/ml de cDNA y se completó con H₂O (Sigma) hasta 25 μ l totales.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en termociclador siguiendo el siguiente programa: 5 minutos a 95°C; 45 ciclos de la siguiente secuencia: 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 60°C y 45 segundos a 72°C. La reacción finalizó con 6 minutos a 72°C y se conservaron los productos de la reacción a 4°C. Los resultados de PCR se colocaron en el aparato QIAxcel (Qiagen) y se analizaron mediante el software de análisis de gel QIAxcel (QIAxcel Biocalculator).

Los cebadores se testaron previamente en cDNAs extraídos de los siguientes tejidos: Músculo liso (FGF2); riñón (EGF); testículos (ciclina β -2); músculo estriado (NT4/5); médula espinal (PDGF); corazón (IGF); hipocampo (BDNF); globo ocular (GDNF, NT3); glándula salivar (NGF- β); cultivo puro de MSCs (CD90, CD44).

Gen	Secuencia del cebador 5'-3'
Ciclina β2	F: ACCCACAGCCTCTGTGAAAC R: CTTGCAGAGCAGAGCATCAG
CD90	F: CTTCAACCACCAAGGATGAGG R: TCTGAACCAGCAGGCTTATG
CD44	F: GGACAGTGGAGTGACCACAA R: TACTATTGACCGGATGCAG
BDNF	F: CTCAGGCAGAATGAGCAATG R: AGCCGTCTGTGCTCTTCACT
PDGF-C	F: GTCCAACCTGAGCAGCAAGT R: ATGAGGAACTTCGGGCTGT
GDNF	F: CCGGTAAGAGGCTTCTCG R: CGTCATCAAACCTGGTCAGGA
IGF	F: GCTGGTGGATGCTCTTCAGT R: GGAAGCAACACTCATCCACA
FGF2	F: GAC CCA CAC GTC AAA CTA CAA CT R: TGT AAC ACA CTT AGA AGCCAG CA
EGF	F: GAACTGTCAGCCAGGTCCTC R: CACCAATTGCTGGTGATTTG
NGF-β	F: GTCTGGGCCCAATAAAGGTT R: CCTGTACGCCGATCAAAAAC
NT4	F: TACAAAGGGGCCCCACAC R: GGAGGAGGAAGAGGAAAAGG
NT3	F: TCAGTGCAAAACATCCCAA R: TCCGATTTTTCTCGACAAGG

Tabla M2. Secuencias de cebadores para la q-PCR de los genes analizados en este estudio.

Todos los cebadores fueron diseñados usando el software Primer-Blast, con Tm de 60°C abarcando las uniones intrón-exón. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

5.- CULTIVO DE LAS LÍNEAS 158N, CÉLULAS MESENQUIMALES DEL LIGAMENTO PERIODONTAL Y CÉLULAS MESENQUIMALES DE LA PULPA DENTAL HUMANA.

Estos tres tipos celulares proceden de muestras conservadas en nuestro laboratorio congeladas en nitrógeno líquido en suero bovino fetal con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

La descongelación de los viales para realizar este estudio se realizó rápidamente en baño a 37°C e inmediatamente se transfirió el contenido a un vial con medio de cultivo. Tras homogenizar con pipeta, se centrifugó a 220 g durante 7 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en medio de cultivo nuevo. Estos dos pasos se repitieron dos veces más y se transfirieron las células a un frasco de cultivo de 75 cc³ donde se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂.

El medio de cultivo de los Oligodendrocitos inmortalizados 158N se compone de DMEM (Sigma) con suero bovino fetal (10%; Gibco), glutamina (2 mmol/l; Sigma), penicilina y estreptomina (100 µg/ml; Sigma). Se mantuvieron en cultivo durante 3 días hasta alcanzar la confluencia del frasco.

El medio de cultivo de las células madre de la pulpa dental y del ligamento periodontal humanos se compone de DMEM (Sigma) con suero bovino fetal (15%; Gibco), glutamina (2 mmol/l; Sigma), ácido ascórbico-2-fosfato (100 µg/ml; Sigma), anfotericina (2.5 µg/ml; Sigma), penicilina y estreptomina (100 µg/ml; Sigma). Se mantuvieron en cultivo durante 7 días hasta alcanzar la confluencia celular.

6.- PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS.

6.1.- ELECCIÓN DE LA ESTRUCTURA A TRASPLANTAR.

Como consecuencia del tratamiento desmielinizante, aparecen diversos focos parcheados y aleatorios de desmielinización en el cuerpo caloso del SNC tal como describen otros autores (Armstrong et al., 2006). Se caracterizan inmunohistoquímicamente por la ausencia de expresión de los dos componentes mayoritarios de la vaina de mielina como son MBP y PLP.

Sin embargo, la fimbria se ve completa y homogéneamente desmielinizada en todos los casos analizados histológicamente (n=61). Este hecho evita la malinterpretación del potencial remielinizante del trasplante si se realiza en una zona *a priori* no desmielinizada.

Además, durante el desarrollo embrionario existen migraciones celulares de progenitores de oligodendrocitos generados en la zona subventricular que migran caudalmente hasta la fimbria y al hipocampo siguiendo el fórnix (Menny et al., 2006), por lo que ésta estructura es de gran interés para explorar la remielinización y activación de posibles nichos oligodendrogénicos en la vida adulta que fueron activos durante el desarrollo embrionario.

6.2.- PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS PARA TRASPLANTE.

Los cultivos de células se lavaron tres veces con HBSS sin Calcio y Magnesio y se separaron de la placa de cultivo mediante digestión de las uniones celulares con tripsina/EDTA (0.25%; Sigma-Aldrich) en HBSS sin Ca y Mg a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se depositaron en un tubo con medio de cultivo con suero para saturar la acción de la tripsina. Se centrifugaron 5 minutos a 220 g y se retiró el sobrenadante.

Las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo y se procedió a su conteo y viabilidad mediante una cámara de Neubauer. Para ello se recogieron 25 µl de suspensión de células y se añadió 25 µl de azul tripán. Previamente al trasplante se volvieron a centrifugar y se lavaron con DMEM sin suero. En la última resuspensión se ajustó el volumen final para obtener 150.000 células/µl (MSCs β actina-GFP: n=36; MSCs GFP-plp/dm20: n=4; 158N: n=4) o 50.000 células/µl (hPOL-SCs: n=4; hDP-SCs: n=4). Se mantuvieron en hielo hasta el momento del trasplante.

6.3.- PREPARACIÓN DE LAS BOLAS DE HEPARINA TRATADAS.

En otros 8 ratones C3H se implantaron bolas de heparina acrílica (Sigma-Aldrich) en las mismas coordenadas estereotáxicas que en los trasplantes de células. De ellos, 4 ratones se implantaron bolas embebidas en FGF8 y 4 operados sham con bolas embebidas en PBS. Las bolas se trocearon para evitar tamaños superiores a 50 µm de diámetro. Se lavaron con PBS seis veces y se embebieron durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de FGF8 a 1 µg/µl en PBS (R&D Systems) o solo PBS para los Operados Sham. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS para eliminar el FGF8 no embebido a la heparina.

6.4.- PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.

Todo el procedimiento quirúrgico se realizó en condiciones de máxima asepsia, incluyendo la limpieza de la mesa, estereotáxico y lupa quirúrgica. Se utilizó material quirúrgico esterilizado mediante autoclavado, guantes desechables tratados con etanol 70%, mascarilla y bata descontaminada.

6.4.1.- PREPARACIÓN PREQUIRÚRGICA.

Durante los treinta minutos previos a la cirugía, se indujo a los ratones un estado analgésico de larga duración (de 8-12 horas post-operatorio) con 0.1 mg/kg de buprenorfina (Buprex, Schering-Plough) inyectada intraperitonealmente.

Transcurrido ese tiempo se anestesiaron con isofluorano (Esteve Veterinary) vehiculizado en una mezcla de oxígeno y aire y se colocaron en el aparato estereotáxico (Stoelting, Wheat Lane

Wood Dale). Mediante una mascarilla adaptada al estereotáxico se ajustó la dosis de isoflurano a un nivel adecuado para el mantenimiento de la anestesia comprobando la frecuencia y profundidad respiratoria (Figura M5A). Antes de conectar los focos de la lupa quirúrgica, se protegieron los ojos del animal con gel oftálmico y se mantuvieron cerrados con una cinta adhesiva para evitar daños en la córnea por la desestructuración de la capa de lágrima.

6.4.2.- CIRUGÍA.

Se impregnó el cuero cabelludo con una gasa estéril empapada en etanol 75% y se rasuró con navaja el lugar de la incisión. Mediante otra gasa empapada se retiraron los restos de pelos del campo quirúrgico y se impregnó el lugar de la incisión con solución de povidona yodada. Al secar se realizó una incisión con bisturí siguiendo la sutura sagital para exponer la superficie ósea, se retiró el periostio y se recolocó el cráneo en el esterotáxico, situando a lambda y bregma alineados en el plano horizontal (Figura M5B).

Las inyecciones se realizaron estereotáxicamente en la fimbria derecha en las siguientes coordenadas del hemisferio derecho (Paxinos et al., 2001): anteroposterior -1.1 mm y mediolateral -1.6 mm relativo a bregma (Figura M5B). En esas coordenadas se realizó un orificio en el hueso parietal derecho con un trépano de 1mm de diámetro hasta dejar al descubierto la superficie meníngea. Se realizó una válvula autosellable en la duramadre mediante una punta de aguja de insulina y se introdujo la aguja de inyección -2.6 mm perpendicularmente al plano horizontal desde la superficie meníngea (Figura M5C).

Para realizar el trasplante de los distintos tipos celulares o DMEM en el caso del grupo Operado Sham, se utilizó una jeringa Hamilton de 5 μ l acoplada mediante un tubo relleno de aceite estéril a un capilar estéril de vidrio previamente siliconizado para evitar la adherencia de las células al mismo. De esta forma se evita la formación de burbujas de aire que impidan introducir volúmenes exactos de trasplante por la compresión-distensión de las burbujas de aire. Para causar el mínimo daño posible en el parénquima nervioso, la punta del capilar se estrechó térmicamente hasta alcanzar aproximadamente un diámetro interno de 100 μ m y externo de 120 μ m. Para comprobar el calibre se utilizó una regla micrométrica bajo lupa. Las bolas de heparina se implantaron directamente con la jeringa Hamilton.

Se trasplantó un volumen total de 2 μ l con 300.000 células β -actina/GFP MSCs, 300.000 células 158N, 100.000 hPOL-SCs y 100.000 hDP-SCs en DMEM sin suero a una velocidad de 0.5 μ l/minuto. El grupo Operado Sham (n=32) fue intervenido inyectando el mismo volumen de solución vehículo sin células siguiendo el mismo protocolo. La fimbria izquierda se consideró control interno de desmielinización en todos los grupos experimentales (grupo Control).

Una vez finalizada la inyección se esperó 3 minutos antes de retirar la aguja para igualar presiones y evitar el reflujo de células. Para finalizar, se unieron los bordes de la incisión con pegamento quirúrgico y se trató con povidona yodada.

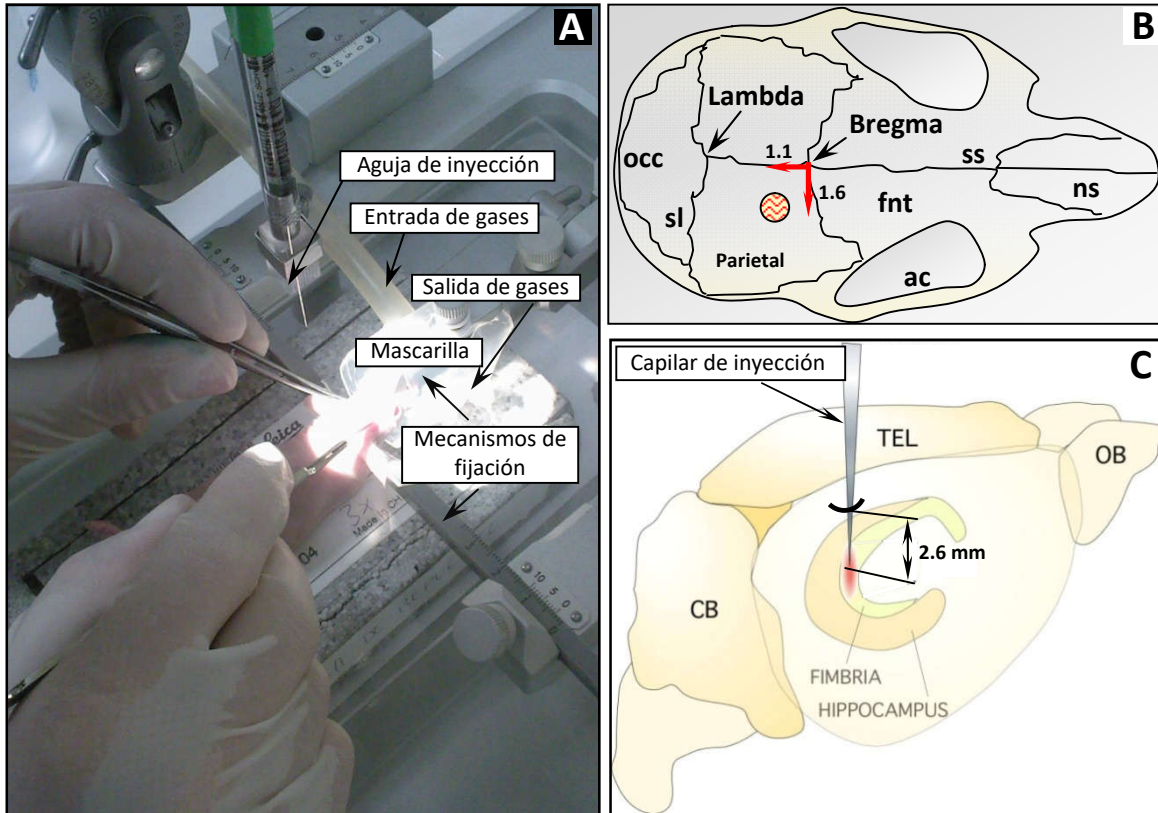


Figura M5: Procedimiento quirúrgico.

(A): Fotografía del acto quirúrgico de un ratón Nude cuando se le practicaba la incisión. Obsérvese la fijación del cráneo al estereotáxico para conseguir la correcta alineación de lambda y bregma, la aguja de inyección y el sistema de circulación de anestesia. A la derecha de la imagen (no mostrado) se encuentra un sistema de aspiración para retirar el exceso de gases. Arriba de la imagen (no mostrado) se encuentra la fuente de iluminación fría y la lupa binocular quirúrgica.

(B): Esquema de la superficie craneal del ratón mostrando la posición de la ventana quirúrgica realizada con trépano (círculo) en el hueso parietal respecto a bregma. Al fondo la meninge y los vasos meníngeos.

(C): Representación tridimensional del trasplante mostrando el alcance del capilar desde la superficie meníngea.

Ac: arco cigomático; cb: cerebelo; fnt: hueso frontal; ns: hueso nasal; ob: bulbo olfatorio; occ: hueso occipital; sl: sutura lambdaoidea; ss: sutura sagital; tel: telencéfalo. (B): Adaptado de Paxinos et al., 2001.

6.4.3.- REANIMACIÓN.

Se reanimó al animal interrumpiendo el flujo de isofluorano y sustituyéndolo por oxígeno 100%. Una vez comenzó a despertar se colocó en una jaula individual limpia y seca atemperada a 37°C con una manta térmica hasta la completa recuperación de la conciencia. Tras 12 horas se administró una segunda dosis de buprenorfina a la misma concentración que previa a la cirugía.

Los días posteriores a la cirugía se alimentó al animal con dieta sin cuprizona y se observó el comportamiento y aspecto de la herida para descartar posibles infecciones.

7.- HISTOLOGÍA.

7.1.- PERFUSIÓN PARA INMUNOFLUORESCENCIA.

Los ratones (n=57) se anestesiaron en una cámara con una atmósfera saturada de isoflurano. Antes de que aconteciera el fallo cardiorrespiratorio y una vez el animal perdió la sensibilidad ante estímulos dolorosos, se realizó una toracotomía seccionando la parrilla costal siguiendo la línea paraexternal dejando accesible el corazón. Se introdujo una cánula de 0.5 mm por el ápex del ventrículo izquierdo hasta la raíz aórtica donde se clampó para mantener la cánula en el cono aórtico y evitar el reflujo de las soluciones de lavado y fijación.

Posteriormente se realizó un corte en la aurícula derecha para, inmediatamente, iniciar la exanguinación introduciendo un flujo de 2 ml/min de 40 ml de PBS 0.1M (1x) pH 7.4 filtrado a 4°C mediante bomba peristáltica. Tras clarear el hígado (indicador del lavado sanguíneo), utilizando un sistema de llaves de paso para no interrumpir el flujo, se comenzó la fijación del tejido con 100 ml de PFA al 4% en PBS 1x, pH 7.4 a 4°C filtrado.

7.2.- PERFUSIÓN PARA INMUNOHISTOQUÍMICA.

Se realiza de forma similar al apartado anterior (n=10), con los siguientes cambios: la exanguinación se realizó con nitrito sódico (1%) en PBS (1X) a 4°C sin filtrar. La fijación se realizó con solución Zamboni a 4°C compuesta por PFA (4%), ácido pícrico (15%) en PB (0.1 M; pH 7.4).

7.3.- PROCESADO DEL TEJIDO.

Comprobada la correcta fijación, se decapitó el animal, se eliminó la bóveda craneal y se extrajo el cerebro con cuidado de no dañar su superficie. En placa Petri con PFA o Zamboni (según el caso) se eliminaron bajo lupa todos los restos de duramadre para permitir un correcto penetrado de las soluciones que se aplicaron en los sucesivos pasos, que se realizaron a 4°C y en agitación continua:

- Postfijación durante toda la noche mediante inmersión en 15 ml de PFA o Zamboni a 4°C en agitación (Roller Mixer).

- Crioprotección del tejido manteniendo las muestras durante 12 horas en una solución de 15% de sacarosa (Scharlau) en PBS 1x. Después se sustituyó por 30% sacarosa en PBS 1x y se mantuvieron durante 24 horas en agitación continua.

- Finalmente las muestras se embebieron en Medio de congelación Neg-50 (Richard-Allan Scientific) orientando correctamente la muestra dentro de unos moldes apropiados para tal fin.

Las muestras se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido a -190°C . Para evitar el cambio brusco de temperatura y con ello la rotura del tejido, se colocó el molde en un baño de isopentano evitando el contacto directo con el nitrógeno líquido. Finalmente se almacenaron a -20°C hasta ser procesados.

7.4.- OBTENCIÓN DE SECCIONES.

Se obtuvieron secciones seriadas de $12\ \mu\text{m}$ de grosor paralelas al plano coronal o longitudinales (según el estudio) mediante un criostato Microm HM525 a -20°C . Las secciones se recogieron directamente en portaobjetos de vidrio pretratados Superfrost (Thermo Scientific) en siete series consecutivas obteniendo una representación completa del encéfalo en cada una de las series, desde los bulbos olfatorios hasta la parte caudal de los hemisferios telencefálicos. Es decir, cada sección de cerebro dentro de una misma serie dista de la siguiente sección $72\ \mu\text{m}$. Al finalizar se almacenaron a -20°C hasta ser utilizadas para Inmunohistoquímica o Inmunofluorescencia.

7.5.- INMUNOFLUORESCENCIA.

Todas las diluciones preparadas de anticuerpo primario, secundario y estreptavidina-fluoróforo que se detallan a continuación se centrifugaron 5 minutos a 10000 rpm para precipitar agregados.

7.5.1.- BLOQUEO DE UNIONES INESPECÍFICAS.

Las secciones se incubaron durante 1 hora a 37°C con el fin de extender el tejido y aumentar la adherencia del mismo al vidrio pretratado del portaobjetos, pues la fimbria es una estructura frágil que en el plano coronal únicamente presenta inserción al hipocampo por su base. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS 1x a temperatura ambiente durante 10 minutos cada uno para eliminar los restos del medio de congelación y de la sacarosa a 30%.

Se bloquearon las uniones no específicas a la vez que se permeabilizó el tejido mediante una incubación con 10% de suero de caballo y 0.25% de tritón (respectivamente) en PBS 1x durante 2 horas a temperatura ambiente.

7.5.2.- ANTICUERPOS PRIMARIOS.

Se realizaron inmunofluorescencias de doble marcaje. Se reservó el canal de fluorescencia verde para localizar las células trasplantadas. Éstas expresan la proteína verde fluorescente GFP (MSCs, hPOL-SCs y hDP-SCs) y/o poseen el fenotipo diferencial de superficie H2d^b, lo que las diferencia de las células propias del tejido trasplantado de haplotipo H2k^k (característica que sucede en los tres tipos celulares anteriores y los oligodendrocitos inmortalizados 158N). Se reservó el canal de fluorescencia roja o infrarroja para localizar cualquier otra molécula que se describe a continuación:

A) Para identificar las células progenitoras de oligodendrocitos (CPOs) se usaron anticuerpos de conejo o cabra anti-proteinglicano NG2 IgG (1:150 o 1:50 respectivamente; Santa Cruz Biotechnology, INC); y cabra anti-Olig2 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, INC) para detectar oligodendrocitos tempranos. Los oligodendrocitos se marcaron usando ratón anti-O4 IgM (1:500; Chemicon International). Los astrocitos se detectaron con rata anti-proteína fibrilar ácida gliar (GFAP) IgG (1:500; AbCam). Las células de Schwann con cabra anti-S100 IgG (1:50; Santa Cruz Biotechnology, INC).

B) La mielina se marcó mediante el uso de anticuerpos de ratón anti-proteína básica de mielina (MBP) IgG (1:100; Oncogene Research Products) presente en la membrana interna de oligodendrocitos productores de mielina. Rata anti-proteína proteolipídica de mielina (AA3-PLP) IgG (1:50; Millipore, Billerica) presente en la membrana externa de los oligodendrocitos formadores de mielina; y ratón anti-proteína de mielina específica de oligodendrocitos (MOG) IgM (1:500; Chemicon International).

C) Se analizó la expresión de marcadores neurales mediante el marcaje con ratón anti-Tuj1 IgG (1:700; Covance) que reconoce axones neurales y neuroblastos; ratón anti-Nestina humana (1:100; Chemicon International) que marca filamentos intermedios de progenitores neurales.

D) Las moléculas implicadas en migración celular se detectaron mediante marcaje de conejo anti-Semaforina 3F IgG (1:200; Abcam) que interviene la guía axonal y en el proceso de migración y diferenciación de oligodendrocitos; y ratón anti-NCAM (1:20; Thomas M. Jessell and Jane Dodd), molécula de la matriz extracelular implicada en la migración celular.

E) Los marcadores de la estirpe mesenquimal se detectaron con ratón anti-Stro1 IgM (1:200; Chemicon International); ratón anti-CD44 humano (1:125; BD Pharmingen); y ratón anti-CD90 humano (1:200; BD Pharmingen).

F) La viabilidad de las células trasplantadas se evaluó mediante el marcaje con conejo anti-cfos (1:150; Santa Cruz Biotechnology). La proliferación celular se estimó con marcaje conejo anti-

Ki67 (1:200; Thermo Fisher Scientific). Los progenitores de origen subventricular fueron detectados con hámster anti-Nilo 1 (1:1) procedente del laboratorio del Dr. A. Silva (Del Valle et al., 2010). La respuesta celular frente a factores neurotróficos se evaluó con conejo anti-Fosfo ERK 1/2 (1:100; Abcam).

G) Finalmente, las células trasplantadas se identificaron mediante el marcaje con anticuerpos de ratón anti-haplotipo H2d^b IgG (1:100; BD Pharmingen); ratón anti-GFP monoclonal (1:200; Molecular Probes); o conejo anti-GFP policlonal (1:500; Molecular Probes) según convenía teniendo en cuenta la especie del resto de anticuerpos (tanto primarios como secundarios) utilizados en el proceso para evitar incompatibilidades y hetero uniones.

Las muestras se incubaron durante toda la noche con estos anticuerpos primarios en PBS 1x con 1% suero de caballo y 0.25% de tritón X100 a temperatura ambiente y atmósfera saturada de humedad para evitar las pérdidas por evaporación.

7.5.3.- ANTICUERPOS SECUNDARIOS.

Al día siguiente se eliminó el anticuerpo primario y se realizaron tres lavados de 10 minutos en PBS 1x, con 1% suero de caballo y 0.25% de tritón X100. Seguidamente se incubaron durante dos horas con los correspondientes anticuerpos secundarios anti-especie de la que fue obtenido el anticuerpo primario en PBS 1x, con 1% suero de caballo y 0.25% de tritón X100:

A) Fluorescencia verde: para revelar tanto el haplotipo H2d^b así como para potenciar la fluorescencia verde intrínseca del GFP y facilitar su localización, se utilizó burro anti-ratón IgG o anti-conejo IgG (según el primario) conjugado con Alexa Flúor 488 (1:500; Molecular Probes) que emite fluorescencia verde al iluminar la muestra con luz polarizada de 488nm. Igualmente, la proteína verde fluorescente, también emite este color al irradiar la muestra con la misma longitud de onda.

B) Fluorescencia roja: se utilizó burro anti-ratón IgG, anti-conejo IgG, anti-cabra IgG, anti-rata IgG (evitando la especie de donde se obtuvo el anticuerpo primario que se quiere revelar) conjugado con Alexa Flúor 594 (1:500; Molecular Probes) que emite fluorescencia roja al iluminar la muestra con luz polarizada de 594 nm.

C) Fluorescencia infrarroja: en el caso de hámster anti-Nilo1, se incubó con un anticuerpo biotinilado anti-hámster (1:100; Vector Laboratories). Posteriormente se lavó tres veces durante 10 minutos en PBS 1x, con 1% suero de caballo y 0.25% de tritón X100. El anticuerpo biotinilado se reveló tras una incubación con estreptavidina conjugada con CyTM5 (1:500; GE Healthcare. PA45001) que emite fluorescencia infrarroja al iluminar la muestra con luz polarizada de 670 nm.

D) Fluorescencia azul: en el caso de conejo anti-c-fos, se incubó con un anticuerpo biotinilado anti-conejo (1:200; Vector Laboratories). Posteriormente se lavó tres veces durante 10 minutos en PBS 1x, con 1% suero de caballo y 0.25% de tritón X100. El anticuerpo biotinilado se reveló tras una incubación con estreptavidina conjugada con acetato de coumarina aminometilado (AMCA), que emite fluorescencia azul al iluminar la muestra con luz polarizada ultravioleta (1:500; Vector Laboratories).

7.5.4.- MARCAJE NUCLEAR Y MONTAJE.

Finalizada la última incubación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS 1x. En todos los casos (excepto en el marcaje de c-fos en los que se utilizó AMCA), se realizó un último marcaje durante 5 minutos con 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) que se intercala específicamente al DNA nuclear emitiendo fluorescencia azul tras iluminar la muestra con luz polarizada ultravioleta (2µg/ml en PBS 1x; Molecular Probes). Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS y se montaron con Mowiol-NPG.

7.5.5.- CONTROLES.

En todos los casos se realizaron controles en dos portaobjetos para cada marcaje siguiendo el mismo procedimiento, pero eliminando o bien el primer o el segundo anticuerpo.

7.6.- INMUNOHISTOQUÍMICA.

Todas las diluciones preparadas de anticuerpo primario, secundario y estreptavidina-peroxidasa que se detallan a continuación, se centrifugaron 5 minutos a 10000 rpm para precipitar agregados.

7.6.1.- BLOQUEO DE LAS UNIONES INESPECÍFICAS.

Las secciones se incubaron durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se lavaron con PBS 1x a temperatura ambiente durante 15 minutos, seguido de tres lavados con etanol al 50% en PBS 1x de 15 minutos cada uno y finalmente un último lavado con PBS 1x durante 15 minutos. Se realizó un primer bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% en PBS con 0.3% tritón X100. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS 1x con tritón 0.3% durante 10 minutos y se bloquearon las uniones no específicas con 20% de suero de caballo en PBS 1x y tritón 0.3% durante 2 horas a temperatura ambiente.

7.6.2.- ANTICUERPOS PRIMARIOS.

En este caso únicamente se realizaron tinciones simples para estudiar la expresión de las siguientes moléculas:

A) Factores neurotróficos mediante el uso de los siguientes anticuerpos: oveja anti-Neurtulina (NTN), (1:2000; Chemicon), oveja anti-Factor Neurotrófico 3 (NT3), (1:200; Abcam), oveja anti-Factor Neurotrófico 4/5 (NT4/5), (1:200; Chemicon), conejo anti-Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF), (1:500; Santa Cruz Biotechnology), oveja anti-Factor Neurotrófico Derivado de Glía (GDNF), (1:500; Santa Cruz Biotechnology), ratón anti-Factor de Crecimiento Fibroblástico 8 (FGF-8), (25µg/ml; R&D Systems), oveja anti-Factor de Crecimiento Nervioso β (NGF- β), (1:500; Chemicon), conejo anti-Factor de Crecimiento Epitelial Vascular (VEGF), (1:100; Santa Cruz Biotechnology) y cabra anti-Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), (1:200; Santa Cruz Biotechnology).

B) La sensibilidad de las células a los factores neurotróficos se evaluó con conejo anti-Receptor de baja afinidad del Factor Neurotrófico p75 (p75-NTFR), (1:700; Chemicon).

Las muestras se incubaron durante toda la noche con estos anticuerpos primarios en PBS 2x con 1% suero de caballo y 0.3% de tritón X100 a temperatura ambiente y atmósfera saturada de humedad para evitar las pérdidas por evaporación.

7.6.3.- ANTICUERPOS SECUNDARIOS.

Al día siguiente, se eliminó el anticuerpo primario y se realizó un primer lavado de 5 minutos con PBS 1x, para seguidamente realizar tres lavados de 15 minutos en PBS 1x, con 1% suero de caballo y 0.1% tween. Posteriormente se incubaron las muestras durante dos horas con los correspondientes anticuerpos secundarios biotinizados anti-especie de la que fue obtenido el anticuerpo primario en PBS 1x, con 1% suero de caballo y 0.1% tween. Se utilizaron los siguientes según convenía: anti-oveja, anti-conejo, anti-ratón y anti-cabra (1:200; Vector Laboratories).

7.6.4.- AMPLIFICADO.

Tras la incubación del anticuerpo secundario, se realizaron tres lavados de 15 minutos. El primero en PBS 1x, con 1% suero de caballo y 0.1 % tween. Los dos restantes sin suero de caballo. Posteriormente se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con el complejo conjugado peroxidasa-estreptavidina en PBS 1x con 0.1% tween (1:500; ABC Elite Kit) que fue preparado una hora antes en una relación 1:1.

7.6.5.- REVELADO.

Tras el amplificado se realizaron tres lavados de 15 minutos. El primero con PBS 1x con 0.1% tween. Los dos restantes solo con tampón salino tris (TBS) 0.05M (1x) pH 7.5. El revelado se realizó tras una preincubación con una dilución filtrada de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) en TBS 1x durante 10 minutos (1%; Applichem). Posteriormente se añadió peróxido de hidrógeno a la solución de DAB-TBS hasta alcanzar una concentración final del 0.03%. La reacción se siguió durante 4 minutos y se paró con varios lavados de TBS 0.05 M. Tanto la preincubación como la incubación se realizaron en oscuridad.

7.6.6.- MONTAJE.

El tejido se deshidrató sumergiendo los portaobjetos en disoluciones crecientes de etanol durante 5 minutos cada una (50%, 75%, 95% y 2 x 100%). Posteriormente se realizaron otros dos baños en xilol y se montaron con Eukitt.

7.6.7.- CONTROLES.

En todos los casos se realizaron controles en dos portaobjetos para cada marcaje siguiendo el mismo procedimiento pero eliminando o bien el primer o el segundo anticuerpo.

7.7.- MICROSCOPIOS.

Las muestras histológicas se observaron mediante un microscopio de fluorescencia (Leica DM6000D; Leica Microsystems) y microscopio confocal (Leica DMR). Se tomaron micrografías con cámaras Leica DFC350/FX y DC500.

8.- ANÁLISIS ELECTROFISIOLÓGICO.

Estos experimentos se realizaron para medir la velocidad de conducción de los axones de la fimbria en diferentes grupos experimentales: trasplantados con MSC (n=8), operados sham (n=3), controles (n=11) y normales (n=7). Los registros se realizaron *in vitro* en preparaciones fimbria-hipocampo tras 3 meses de recuperación post cirugía.

8.1.- PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

Los animales se anestesiaron con isofluorano y se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se extrajo el cerebro y se introdujo en placa petri con solución extracelular fría compuesta por:

NaCl (124 mM), KCl (2.5 mM), NaH₂PO₄ (1.25 mM), NaHCO₃ (26 mM), CaCl₂ (2 mM) a partir de una solución 2 M previamente burbujeada con carbógeno, al que se le añadió MgCl₂ (1 mM) y glucosa (10 mM). La osmolaridad de la solución es de 300 mOsm/Kg y un pH de 7.4.

El complejo fimbria-hipocampo (Figura M6A) se diseccionó con ayuda de una lupa binocular y se fijó en una placa tratada con sylgar con ayuda de varillas de plata para evitar movimientos e interferencias durante los registros.

8.2.- REGISTROS.

Los registros se realizaron con el tejido inmerso en solución extracelular con 5% con CO₂ y 95% de O₂ a temperatura ambiente (24.3-26.3 °C) en una cubeta situada en la base de un microscopio vertical.

En el grupo Operado Sham se detectó el lugar de inyección localizando la cicatriz producida por la cirugía (Figura M6A), mientras que en el grupo operado con MSCs el trasplante se detectó por su fluorescencia GFP nativa (Figura M6B y C).

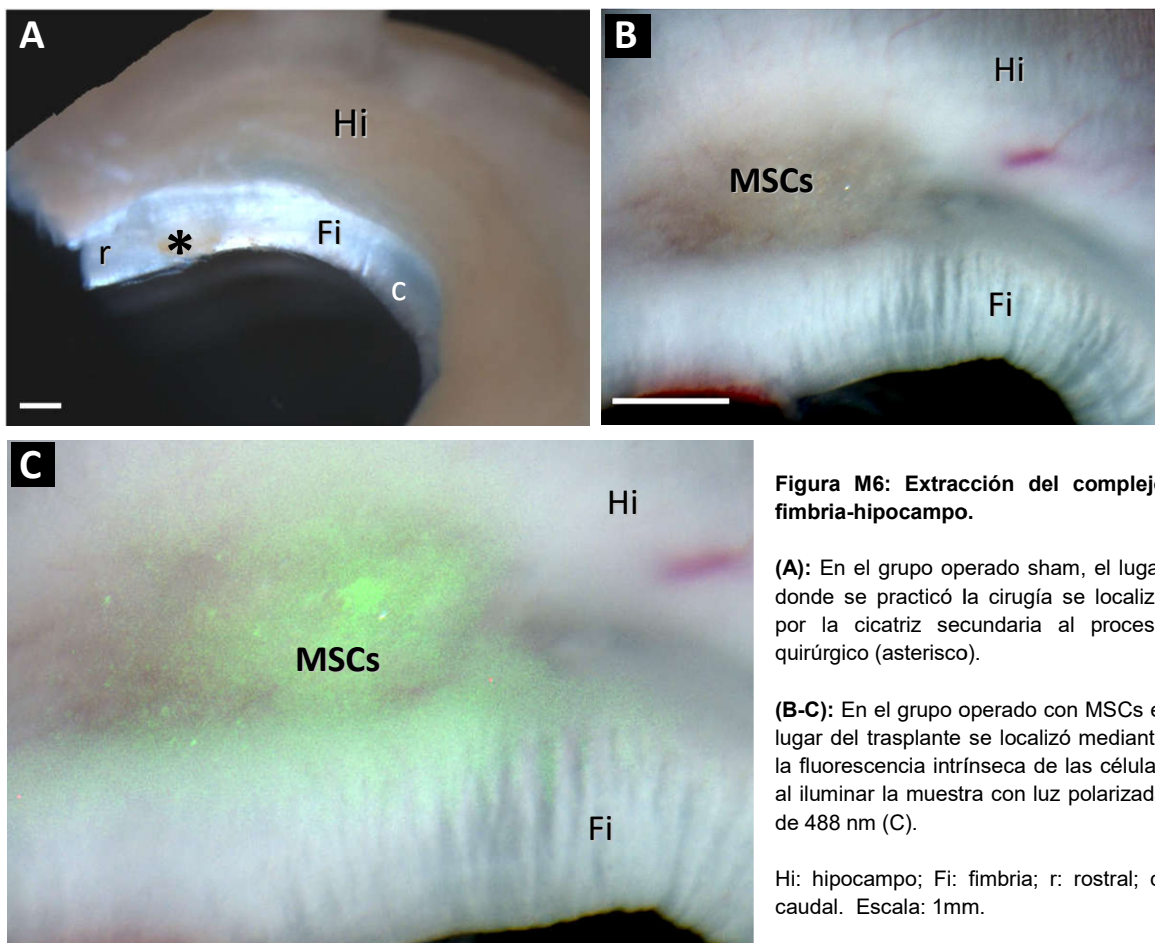


Figura M6: Extracción del complejo fimbria-hipocampo.

(A): En el grupo operado sham, el lugar donde se practicó la cirugía se localizó por la cicatriz secundaria al proceso quirúrgico (asterisco).

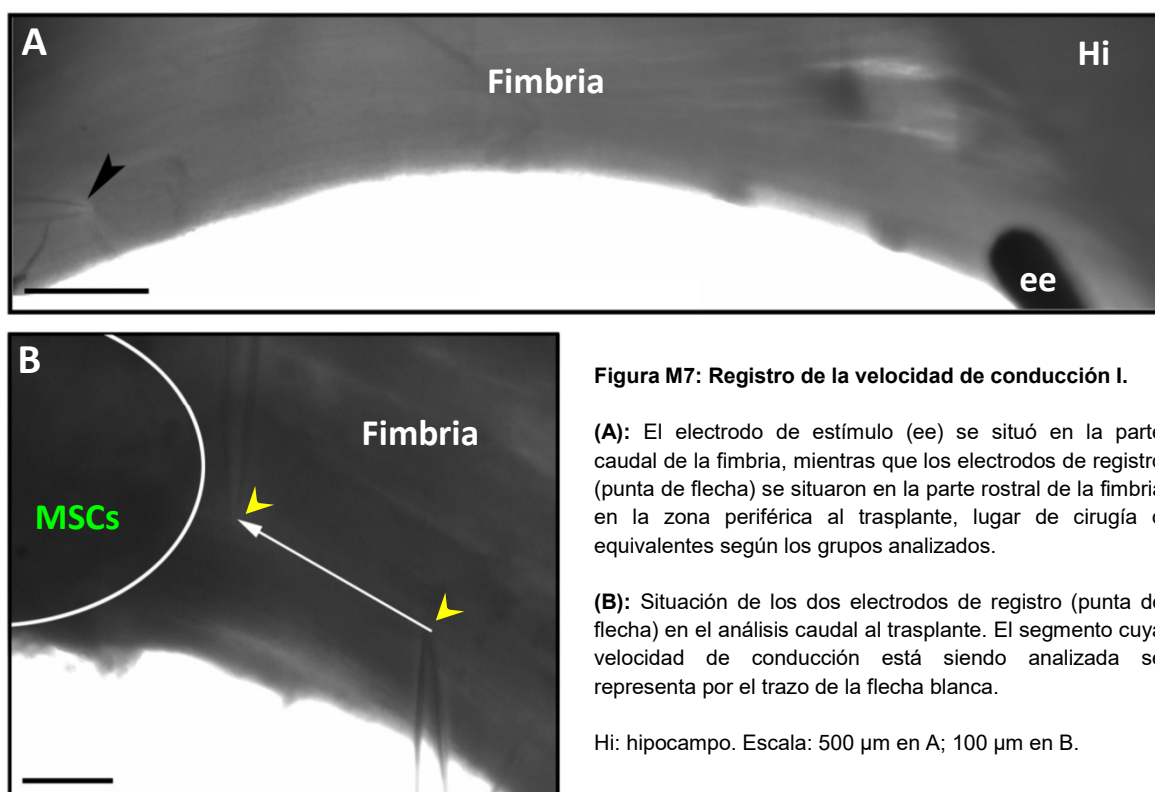
(B-C): En el grupo operado con MSCs el lugar del trasplante se localizó mediante la fluorescencia intrínseca de las células al iluminar la muestra con luz polarizada de 488 nm (C).

Hi: hipocampo; Fi: fimbria; r: rostral; c: caudal. Escala: 1mm.

La fimbria se estimuló desde el extremo caudo-lateral con un electrodo concéntrico bipolar (Frederick Haer & Co) utilizando pulsos de 0.1 ms de duración y de 0.3 a 50 mA (Figura M7A).

Para registrar extracelularmente la velocidad de transmisión de la señal se utilizaron simultáneamente dos electrodos obtenidos a partir de pipetas de vidrio estrechadas térmicamente hasta conseguir una resistencia al flujo de 0.2-5 M Ω y se rellenaron con solución extracelular.

En el grupo Operado Sham y el grupo Trasplantado con MSCs, los dos electrodos de registro se colocaron en paralelos a los axones de la fimbria en cuatro lugares periféricos a la cicatriz de inyección de solución vehículo o trasplante respectivamente: rostro-medial (R), caudo-lateral (C), paralelo (L) e interior al trasplante (I) (Figura M7B). En el grupo control y normal se registraron zonas equivalentes a las anteriores.



Al utilizar dos electrodos de registro se eliminan los retrasos o interferencias producidas por los distintos grados de desmielinización que puedan haber en el tramo axonal situado entre el electrodo de estímulo y el primer electrodo de registro. De este modo se muestrea de forma muy precisa la velocidad de conducción en la zona de influencia del trasplante (Figura M8). La velocidad de conducción se calculó según la fórmula:

$$\text{Velocidad de transmisión (m/s)} = \text{espacio entre electrodos (mm)} / \text{tiempo de demora (ms)}$$

Siendo el tiempo de demora la latencia (en milisegundos) del potencial de acción propagado entre ambos electrodos de registro; y el espacio entre electrodos la distancia que los separa en píxeles.

Para la cuantificación se tomaron imágenes a la misma escala de la zona en la que se sitúan ambos electrodos de registro y se realizaron tres medidas del espacio existente entre los dos electrodos de registro desde la zona central del electrodo (flecha blanca en la Figura M7B). Los valores se obtuvieron mediante el programa de análisis de imagen Image J (Wayne Rasband, NIH).

Para el cálculo de la velocidad de transmisión se tomó como válida la media de estas tres medidas y se representaron los resultados en medidas del sistema internacional (metros/segundos) previa conversión de píxeles en unidades de distancia (μm) mediante una escala de calibración fotografiada al mismo aumento.

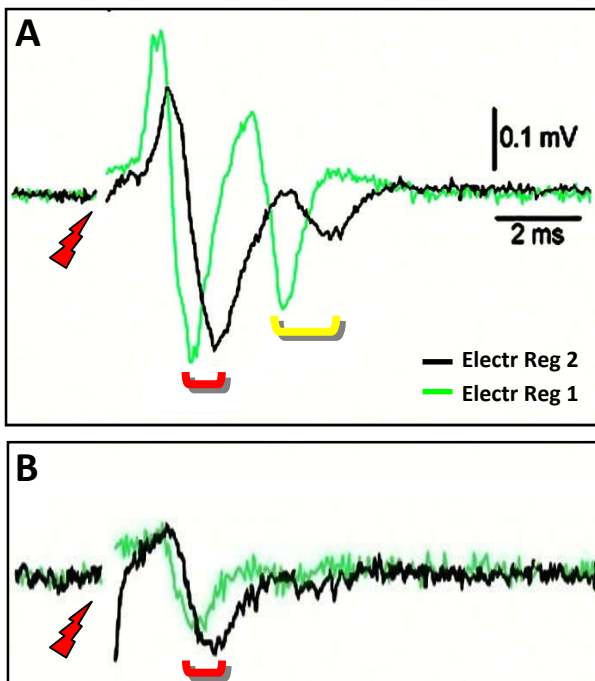


Figura M8: Registro de la velocidad de conducción II

(A): De la preparación de la imagen M7 se obtiene el siguiente registro. Tras el impulso emitido con el electrodo de estímulo (flecha quebrada roja), se detecta en primer lugar la despolarización de las fibras de conducción rápida (corchete rojo) tanto en el electrodo de registro 1 (línea verde) como, posteriormente, en el electrodo de registro 2 (línea negra). Con mayor tiempo de latencia en los mismos electrodos se registran las fibras de conducción lenta (corchete amarillo) que transmiten el mismo impulso anterior a una velocidad menor.

(B): Misma comparativa si el estímulo se realiza cercano al hipocampo, donde desaparece el registro de las fibras de conducción lenta.

En el eje vertical se representa la amplitud de voltaje detectado en milivoltios. En el eje horizontal el tiempo en milisegundos.

9.- CULTIVOS DE FIMBRIAS TRASPLANTADAS Y NEUROESFERAS.

9.1.- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.

En este experimento se utilizaron 3 ratones trasplantados con MSCs 12 semanas tras la cirugía. El cerebro se extrajo al igual que se describe en el punto anterior y se eliminaron los restos de duramadre bajo lupa en D-MEM a 4°C.

9.2.- ENCASTRACIÓN Y CORTADO.

Se encastró el encéfalo en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% en PBS. Para ello, el día anterior se disolvió la agarosa en PBS caliente y se mantuvo en baño a 42°C durante 8 horas para que se enfriara sin llegar a solidificar. Tras encastrar el encéfalo se dejó solidificar poniendo el bloque en hielo. Inmediatamente se obtuvieron cortes de 350 µm de grosor mediante vibratomo con D-MEM a 4°C. Posteriormente se localizaron las MSCs por su fluorescencia intrínseca tras iluminar las rodajas de tejido con luz polarizada de 488 nm y bajo lupa se obtuvieron 4 tipos de muestra:

A) Fimbrias: Para comprobar la viabilidad de las células trasplantadas, se extrajo la fimbria trasplantada con MSCs y la contralateral (control).

B) Subepéndimos: Para estudiar el potencial de transdiferenciación de las MSCs trasplantadas en sistema nervioso, se extrajo el subepéndimo ventral del ventrículo lateral contralateral (control) e ipsilateral al trasplante donde existen MSCs integradas en el subepéndimo (ver resultados).

9.3.- CULTIVO.

Los fragmentos obtenidos se lavaron con HBSS sin calcio y magnesio, y se realizó una disgregación química a 37°C con tripsina-EDTA al 0.1% en HBSS sin Ca-Mg durante cinco minutos. Seguidamente el tejido se disgregó mecánicamente mediante pases sobre pipeta de vidrio siliconizado durante 5 minutos más y se bloqueó la actividad proteasa añadiendo DMEM con 10% de suero bovino fetal (DMEM-10s) a 4°C. Se centrifugó 5 minutos a 1200 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en DMEM-10s a 37°C. Posteriormente se continuó disgregando mecánicamente el tejido mediante pases sucesivos sobre pipetas de vidrio siliconizado de calibre progresivamente más estrecho.

La suspensión obtenida de células individualizadas se centrifugaron 5 minutos a 1200 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en medio de cultivo de diferente composición según la muestra con la que se trabaja:

A) Fimbrias contralateral (control) y trasplantadas con MSCs. Medio de cultivo para MSCs: DMEM; sacarosa (30%); suero bovino fetal (10%); penicilina estreptomicina (1mg/ml); aminoácidos no esenciales (1%); piruvato sódico (1%).

B) Subepéndimos ipsi y contralateral al trasplante. Medio de cultivo definido: DMEM; sacarosa (30%); NaHCO_3 (7.5%); HEPES (1M); L-Glutamina (mg/ml); insulina (10mg/ml); penicilina/estreptomicina (1mg/ml); factor de crecimiento epitelial (20 ng/ml); factor de crecimiento de fibroblastos 2 (10 ng/ml); albúmina de suero bovino (10%); heparina (0.2%); solución de hormonas compuesta por Apo-t-transferrina (0.8 mg/ml), solución de putrescina (0.077 mg/ml), progesterona (2 mM) y selenito sódico (3 mM).

Los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% CO_2 en el mismo medio en placas de 25 mm² sin tratar durante diez días en el caso (B). En el caso (A) las placas se trataron previamente con poli-L-lisina (25 µg/ml) y se recambió el medio cada 2-3 días.

9.4.- CULTIVO SECUNDARIO DE NEUROESFERAS.

Transcurridos los primeros 10 días, las neuroesferas primarias se fotografiaron in-vivo en microscopio de fluorescencia invertido. Posteriormente se disgregaron mecánicamente con pipeta de vidrio siliconizada de calibre estrecho. Se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm y se resuspendieron nuevamente en medio definido. Se mantuvieron en las mismas condiciones durante 10 días.

10.- ESTUDIOS DE ULTRAESTRUCTURA.

10.1.- PERFUSIÓN.

Para estudios de ultraestructura se perfundieron 4 ratones Trasplantados con MSCs, 7 Controles, 3 Operados Sham y 3 ratones Normales. Para ello se sacrificó al animal de la misma forma descrita en el apartado 6.1 de Material y Métodos. La fijación del tejido se llevó a cabo con fijador karnowsky filtrado (2% paraformaldehído con 1.5% glutaraldehído) en tampón fosfato (PB) 0.12 M, pH 7.4 con tres gotas de Cl_2Ca al 1%. Todo el proceso se realizó manteniendo la solución a 4°C.

10.2.- POSTFIJACIÓN Y DESHIDRATACIÓN.

Posteriormente se extrajeron los cerebros y se postfijaron en la misma solución a 4°C durante toda la noche. A la mañana siguiente se extrajo el complejo fimbria-hipocampo de forma similar a

los descrito en el apartado 8.1 de Material y Métodos y se lavaron en PB 0.1 M al 7% sacarosa y pH 7.4 a 4°C durante 2 horas.

Seguidamente se fijaron los lípidos mediante tetraóxido de osmio al 1% en tampón cocodilato (0.2 M) pH 7.4 durante 2 horas a 4°C. Tras ello, se lavaron las muestras en tampón cocodilato 0.1 M con sacarosa al 8% durante 5 minutos.

Las muestras se contrastaron durante 2.5 horas con acetato de uranilo al 2.5% en Tampón Michaelis pH 5 a 4°C y oscuridad y se lavaron tres veces con agua destilada durante 6 minutos.

La deshidratación se llevó a cabo con soluciones crecientes de acetona a temperatura ambiente (30-50-70-90%) durante 10 minutos. Se finalizó la deshidratación con 2 baños de acetona al 100%.

10.3.- INCLUSIÓN EN RESINA.

Para la inclusión se utilizó óxido de propileno como agente intermediario entre la acetona y la resina. Se realizaron dos baños de 20 minutos y se embebieron en resina EPON siguiendo el siguiente procedimiento: 2:1, 1:1 y 1:2 partes de óxido de propileno/EPON. El primer baño durante 20 minutos. Los otros dos durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Finalmente se dejó 12 horas en EPON puro con los recipientes destapados para evaporar los restos de óxido de propileno.

Tras este período se confeccionaron los bloques en resina EPON recién preparada y centrifugada para eliminar las burbujas, orientando los axones de la fimbria perpendiculares al plano de corte. La polimerización se llevó a cabo durante 4 días a 60°C.

10.4.- OBTENCIÓN DE SECCIONES.

Se obtuvieron secciones finas (1µm) y ultrafinas (60 nm) en las regiones rostral, caudal y a nivel del trasplante mediante ultramicrotomo con una cuchilla de vidrio para los corte semifinos y con una de diamante para ultrafinos.

10.5.- TINCIÓN AZUL DE TOLUIDINA Y MONTAJE DE SEMIFINOS.

Las secciones semifinas de 1 µm de grosor se depositaron en una gota de agua destilada encima de un portaobjetos de vidrio lavado con etanol al 100%. Al secar se cubrió con azul de toluidina (500 mg/dl) – bórax (500 mg/dl) en placa calefactora a 60°C. La tinción se siguió durante un minuto en caliente y se lavó con agua destilada.

10.6.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Los cortes ultrafinos de 60 nm se montaron sobre ojales de rejillas. Se añadió una gota de citrato de plomo (filtrado) por rejilla y se dejó actuar durante 20 minutos. Posteriormente se lavaron con dos baños de agua destilada y se dejaron secar. Las muestras fueron observadas por el Dr. J.A. Armengol en el microscopio electrónico de transmisión en el departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

10.7.- DISOLUCIONES.

- Tampón Fosfato (0.12 M): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ (358.4 gr/mol), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (156.01 gr/mol) y enrasar a 300 ml con H_2O .

- Tetraóxido de Osmio 1%: Se disolvieron los cristales de OsO_4 con agua destilada para obtener una concentración del 2%. Previo a su uso, se disolvió en tampón cocodilato hasta alcanzar una concentración del 1%.

- Tampón Cocodilato 0.2 M: Cocodilato sódico $3\text{H}_2\text{O}$ (42.8gr), se enrasó a 1 litro con agua destilada. Se ajustó el pH a 7.4.

- Acetato de Uranilo 2.5%: Tampón Mickaelis (5 ml), ácido clorhídrico 7 ml, stock uranilo al 4.8% (13 ml). Se ajustó el pH a 5.

- Tampón Mickaelis: Acetato sódico $3\text{H}_2\text{O}$ (4.855 gr), Veronal sódico (7.357 gr), se enrasó con agua destilada hasta 250 ml.

- Resina EPON (40 ml): glycidether (21.60 gr), DDSA (14.40 gr), NNA (12.64 gr), DMP30 (0.52 gr). Se removió con varilla de vidrio y se centrifugó para eliminar burbujas.

- Citrato de Plomo: citrato de plomo (1 gr), se enrasó a 100 ml con H_2O . Posteriormente se añadieron una a una tantas pastillas de NaOH para que la mezcla quedara totalmente transparente.

11.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL.

Tres meses después del trasplante se extrajeron las fimbrias de 9 ratones (5 fimbrias trasplantadas con MSCs, 3 operadas sham, 8 fimbrias control y 3 fimbrias normales sin

tratamiento alguno). Estos experimentos se desarrollaron en colaboración con el Departamento de Genética de la Universidad de Valencia a cargo de la Dra. Moltó y el Dr. Ivorra.

11.1.- LISIS CELULAR Y AISLAMIENTO DEL RNA.

Los pasos se realizaron con fungibles y condiciones libres de RNAsas. La lisis celular se realizó con 1 ml de Trizol realizando varios pases con la punta de pipeta. Se incubó el homogeneizado durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente se añadieron 200 μ l de de cloroformo y se agitó con la mano durante 30 segundos. Seguidamente se dejó reposar 3 minutos a temperatura ambiente y se separaron las fases centrifugando 15 minutos a 12000 rpm a 4°C.

Se recogió la fase superior acuosa donde se encuentra el RNA y se descartó el resto. Se añadió 500 μ l de isopropanol, se agitó fuertemente con la mano y se dejó 30 minutos reposando en hielo para precipitar el RNA. Se centrifugó 15 minutos a 12000 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se lavó dos veces con 1 ml de etanol 70% preparado con agua-DEPC a -20°C y se centrifugó durante 15 minutos a 12000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado al aire y en hielo. Una vez se tornó completamente transparente se resuspendió en 20 μ l de H₂O (Sigma).

11.2.- CONTROL DE CALIDAD.

La calidad del RNA extraído se comprobó separando las bandas de RNA ribosómico en gel de agarosa al 2%. La pureza y concentración de la muestra se analizó espectrofotométricamente mediante Nanodrop, obteniendo una concentración aproximada de 400 ng de RNA/ml. Se consideró como óptima una relación A_{280}/A_{260} superior a 1.91 tal como se describe en el apartado 4.5 de esta sección.

11.3.- RETROTRANSCRIPCIÓN.

Consiste en transformar el RNA que expresan las MSCs en DNA complementario. Para ello se recogió el volumen suficiente de RNA para tener 1 μ g y se añadieron 2 μ l de exanucleótidos (20 pmoles; Promega). La mezcla se preincubó a 70°C durante 10 minutos. Se puso en hielo y se dio un spin en centrífuga.

Posteriormente se añadió la mezcla de reacción compuesta por: 4 μ l de una mezcla de los 4 desoxinucleótidos tri-fosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; 25 mM cada uno; Takara), 4 μ l de tampón Expand 10X (Roche), 1 μ l de inhibidor de RNAsa ditiotreitól (40 U/ μ l; Roche), 2 μ l de transcriptasa reversa AMV (20 U/ μ l; Finnzymes) y se añadió H₂O libre de RNAsas hasta alcanzar

un volumen de reacción de 40 µl. Se removió con pipeta y se incubó 1 hora a 42°C. Al finalizar la reacción, se enfrió en hielo, se le dio un pulso en centrifuga y se conservó a -80°C.

11.4.- AMPLIFICADO MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL.

Las muestras obtenidas de cDNA se utilizaron para realizar la PCR en tiempo real mediante la detección de fluorescencia emitida por Power SYBR® Green (Applied Biosystems) en StepOne™ Real-Time PCR de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Figura M9).

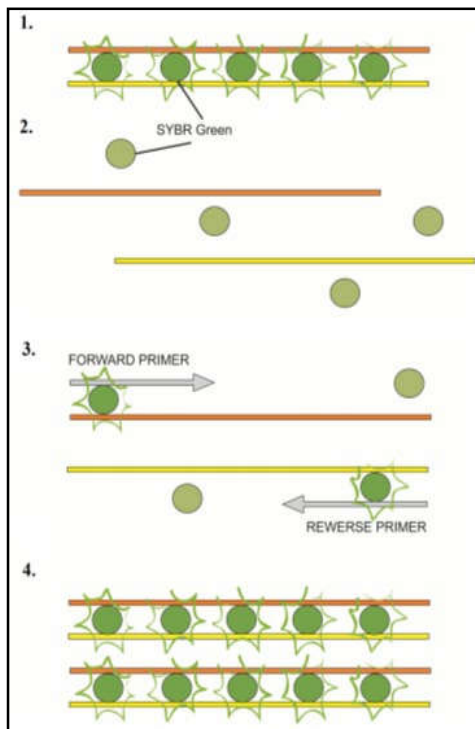


Figura M9: Fundamento de la amplificación en tiempo real mediante el uso de Sybr Green.

Syber Green es una molécula capaz de emitir fluorescencia de 530 nm cuando se excita con una fuente lumínica de 483 nm. Esta propiedad únicamente la posee si se encuentra unido a DNA de doble cadena.

Durante el periodo de polimerización de la PCR, el número de moléculas de Syber Green unidas a DNA será mayor cuanto mayor sea el número de copias amplificado, y por tanto mayor la intensidad de fluorescencia emitida a medida que avanza la reacción.

Esto permite monitorizar en todo momento el estado de la amplificación, siendo la cantidad de fluorescencia emitida proporcional al número de copias de DNA de doble cadena existentes.

Fuente: <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/real-time-pcr>

Mediante esta técnica se analizó la expresión de los siguientes genes:

- A) Genes de referencia: β -actina (ACT- β) y GAPDH
- B) Genes de estudio: FGF8, FGF2, Olig2, IGF y Sprouty 2 (Spy2).

Para ello se diseñaron secuencias específicas de cada cebador según la tabla T3. Los cebadores se testaron en cDNAs extraídos de los siguientes tejidos: Corazón (IGF); médula espinal (Olig2, FGF8); músculo liso (FGF2); hipocampo (β -actina) comprobando que únicamente amplifican un fragmento de tamaño conocido.

Gen	Secuencia del cebador 5'-3'
GAPDH	F: AACTTTGGCATTGTGGAAGG R: GGATGCAGGGATGATGTTCT
ACTINA-β	F: TGG CGC TTT TGA CTC AGG AT R: GGG ATG TTT GCT CCA ACC AA
FGF8	F: GAG CCC ACT TCC CTG CTC R: CTG AGC TGA TCC GTC ACC
FGF2	F: GAC CCA CAC GTC AAA CTA CAA CT R: TGT AAC ACA CTT AGA AGCCAG CA
OLIG2	F: CTA ATT CAC ATT CGG AAG R: AAA AGA TCA TCG GGT TCT
IGF	F: GCT GGT GGA TGC TCT TCA GT R: GGA AGC AAC ACT CAT CCA CA
SPY2	F:GGG TCT CGG AGC AGT ACA AAG R:GTA GGC ATGCAG ACC CAA AT

Tabla M3. Secuencias de cebadores para la PCR en Tiempo Real de los genes analizados en este estudio.

Todos los cebadores fueron diseñados usando el software Primer-Blast, con Tm de 60°C abarcando las uniones intrón-exón.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

En cada pocillo se dispuso de un volumen de reacción de 20 µl: Sybergreen (10µl), H₂O (1µl), cebador directo (0.5µl), cebador inverso (0.5µl), cDNA de la muestra a analizar (4µl) en 4 diluciones: 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000.

La reacción de amplificación se llevó a cabo por triplicado en placas ópticas de 96 pocillos Microamp (Roche) y se monitorizó mediante el sistema de detección de PCR a tiempo real ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). El programa de amplificado se detalla a continuación: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C + 1 minuto a 60°C.

11.5.- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

Se realizó una cuantificación relativa usando el método de curvas estándar. Los datos obtenidos se convirtieron en valores de ciclo umbral (valores Ct) mediante el programa SDS 2.1 (Applied Biosystems). Estos valores indican el número fraccional del ciclo en el que el amplificado alcanza un umbral determinado asignado automáticamente por el programa.

Posteriormente se representaron los logaritmos en base 10 de las concentraciones relativas (en unidades arbitrarias) para cada dilución del gen de referencia (β -actina o GAPDH), frente a la media de los valores Ct de cada triplicado del mismo.

De este modo se obtuvo una recta patrón en la que se extrapolaron los valores Ct de los amplificadores FGF8, FGF2, Olig2, IGF y Spy2 para obtener la concentración inicial relativa de cada uno de ellos (Figura M10).

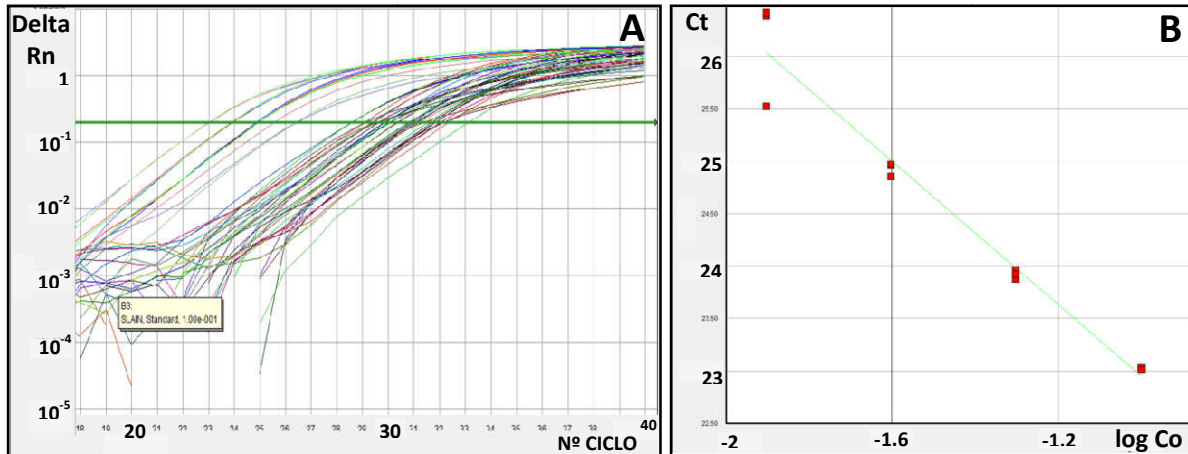


Figura M10: Amplificado de la PCR en tiempo real.

(A): Representación del incremento de la emisión de fluorescencia a medida aumentan el número de ciclos de reacción en la amplificación de FGF8. Cada línea representa un pocillo de cada uno de los triplicados de una de las cuatro diluciones.

(B): Curva patrón en la que se representa el valor Ct frente al log de la concentración inicial del gen de referencia GAPDH.

Las diferencias relativas de expresión se agruparon en tres grupos (Control, Operado Sham y Trasplantado MSCs) y se referenciaron frente al grupo Normal.

Las diferencias que se obtuvieron entre grupos se analizaron estadísticamente usando el t-test. Además, se analizó la correlación entre el nivel de expresión de FGF8 y Spy2. El análisis estadístico se realizó mediante el software SPSS 12.0.

12.- CUANTIFICACIÓN.

12.1.- EXPRESIÓN DE NG2, GFAP Y MBP.

Debido al gran número de ramificaciones citoplasmáticas y alta densidad celular en las áreas estudiadas, es difícil llevar a cabo una cuantificación exacta del número de CPOs, mielina y

astrocitos. Por este motivo, mediante el programa Image J se realizó una cuantificación de píxeles iluminados en secciones seriadas de la fimbria de los diversos grupos experimentales (Figura M11): Trasplantados con MSCs (n=10); Operados Sham (n=4); Controles (n=14), Implantados con bolas de heparina embebidas en FGF8 (n=4); Implantados con bolas de heparina embebidas en PBS (n=4); controles bolas de heparina (n=8); Normales (n=3). Adicionalmente, también se calculó el área de la fimbria.

Se descartaron los valores obtenidos del borde externo de la fimbria dado su alta autofluorescencia por defectos de la adherencia del tejido al portaobjetos. Igualmente se descartaron las zonas de pliegues del tejido u otros artefactos.

En ambos casos, los valores obtenidos se multiplicaron por el grosor del corte (12 μm) y por el número de series entre secciones (7 series) obteniendo así una medida estereológica de volumen (Harting, 2013).

Para normalizar el estudio únicamente se consideraron las siete secciones adyacentes al valor de recuento más elevado, siendo la sección central la de mayor valor de la serie, obteniendo así un análisis de 504 μm de fimbria en dirección rostro-caudal que incluye el trasplante de MSCs o bolas de FGF8, la lesión en el caso de los Operados Sham, o las zonas equivalentes en el grupo Control o grupo Normal.

El volumen total de píxeles iluminados en la fimbria analizada se expresó como porcentaje del volumen total de dicha fimbria (en píxeles) utilizando la fórmula:

$$[\text{volumen píxeles iluminados (pix}/\mu\text{m}^3) / \text{volumen fimbria (pix}/\mu\text{m}^3)] \times 100$$

12.2.- EXPRESIÓN DE FACTORES TRÓFICOS.

Se procedió de forma similar al apartado anterior, pero los valores se normalizaron respecto a la fimbria control no tratada, contralateral a cada caso trasplantado con MSC o operado Sham.

De este modo, un valor de expresión superior a la unidad indica una inmunorreacción mayor en la fimbria tratada respecto a la fimbria control.

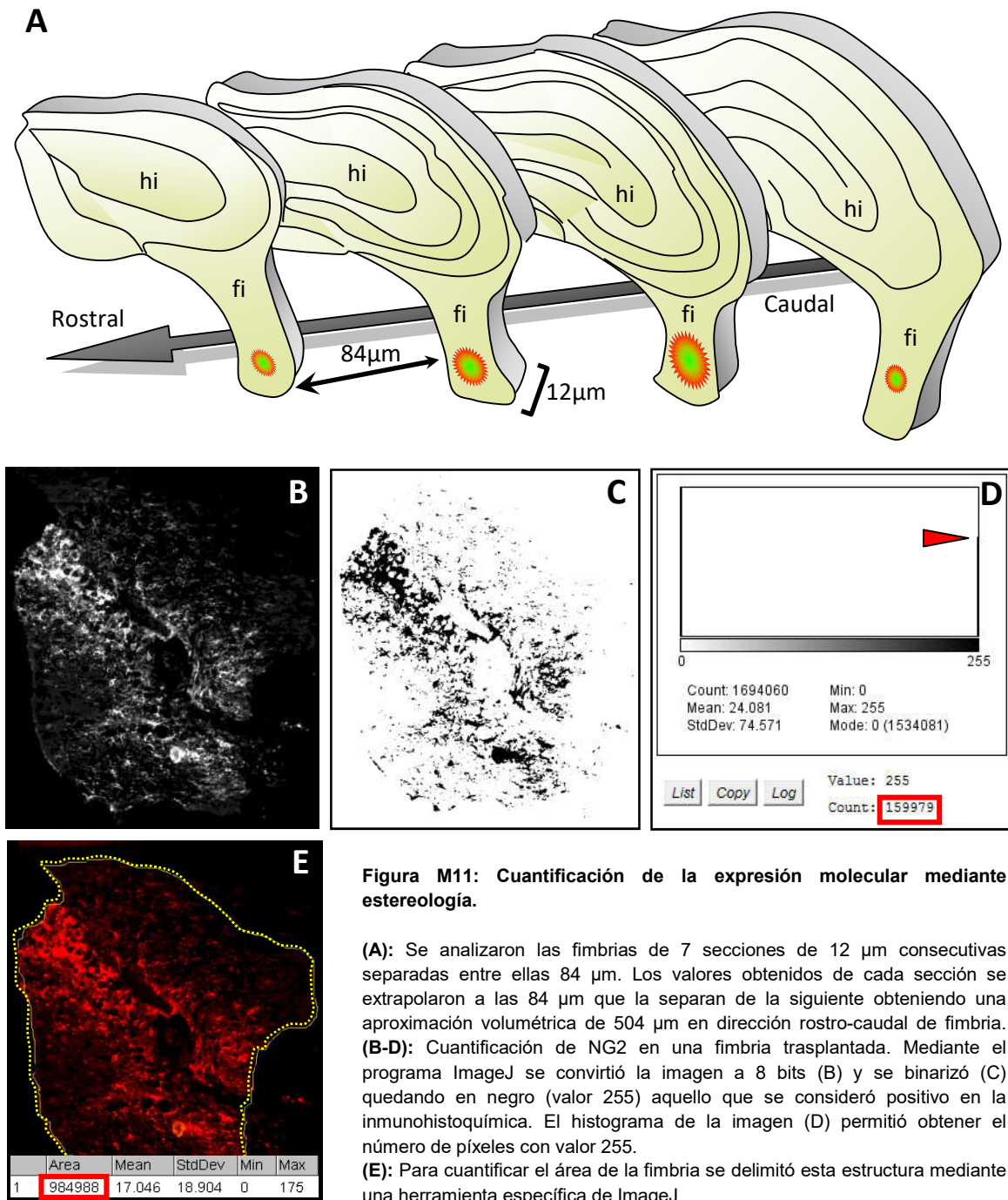


Figura M11: Cuantificación de la expresión molecular mediante estereología.

(A): Se analizaron las fimbrias de 7 secciones de 12 μm consecutivas separadas entre ellas 84 μm . Los valores obtenidos de cada sección se extrapolaron a las 84 μm que la separan de la siguiente obteniendo una aproximación volumétrica de 504 μm en dirección rostro-caudal de fimbria. (B-D): Cuantificación de NG2 en una fimbria trasplantada. Mediante el programa ImageJ se convirtió la imagen a 8 bits (B) y se binarizó (C) quedando en negro (valor 255) aquello que se consideró positivo en la inmunohistoquímica. El histograma de la imagen (D) permitió obtener el número de píxeles con valor 255. (E): Para cuantificar el área de la fimbria se delimitó esta estructura mediante una herramienta específica de ImageJ.

12.3.- CUANTIFICACIÓN DEL DIÁMETRO AXONAL Y GROSOR DE MIELINA.

Se analizaron los 15 axones de mayor tamaño en tres secciones semifinas teñidas con azul de toluidina para el grupo Trasplantado con MSCs (n=6), Control (n=9) y Operado Sham (n=3). Si el eje del axón discurre en un plano distinto al perpendicular respecto al plano de corte presentarán morfología oval a la sección. En estos casos, se tomó el menor de los diámetros del óvalo que corresponde realmente al diámetro axonal.

Para ello, se midieron los diámetros axonales utilizando el borde interno de la vaina de mielina como punto fijo. La distancia al punto opuesto del axón corresponde a su diámetro axonal. El grosor de la vaina de mielina se obtuvo restando el valor anterior, a la distancia desde el punto fijo anterior al borde externo de la vaina de mielina opuesta. Se realizaron 3 mediciones para cada axón y se tomó el valor promedio.

En cada sección se promedió el valor de los 15 axones analizados y a su vez se promedió el valor de las diferentes secciones dentro de un mismo individuo. Los datos de los distintos grupos se normalizaron respecto al grupo Normal (n=3) que se consideró valor 0. Las diferencias se expresaron en porcentajes.

12.4.- CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO Y DENSIDAD DE CÉLULAS EN LA ZONA SUBVENTRICULAR.

Para obtener el número de células presentes en la zona subventricular (SVZ) se contabilizó el número de núcleos teñidos mediante DAPI en la SVZ desde el inicio de los ventrículos laterales rostral al trasplante (o zona equivalente en el caso del grupo Operado Sham) en secciones seriadas.

Conjuntamente se obtuvo el número de píxeles de la SVZ como medida del área de la SVZ de forma similar a lo descrito en el apartado 12.1.

Este valor se multiplicó por el grosor de la sección (12 μm) y por el número de series (7 series) para obtener una medida de volumen que representa la estructura a estudio entre cada sección. Estos valores se agruparon proporcionalmente al número de secciones en tres regiones: rostral (R), medial (M) y caudal (C), siendo la región medial la que incluye el trasplante, obteniendo así los valores promedio para cada región, tanto para el número de células como para la densidad celular (Nº de células/área).

12.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se utilizó el test T-student para muestras independientes para detectar diferencias significativas entre los Operados Sham o los Trasplantados con MSCs y la fimbria Control para cada caso. Para ello se usó el software SPSS Statistic v19.0.0 de IBM.

RESULTADOS

Tras el tratamiento con cuprizona aparecen lesiones de desmielinización distribuidas en varias regiones de la sustancia blanca del parénquima nervioso caracterizadas por la ausencia de MBP y PLP (Figura R1). Sin embargo, mientras que la mayoría del tejido presenta un patrón de desmielinización parcheado y aleatorio (Figura R1B), la fimbria del hipocampo aparece completa y homogéneamente desmielinizada en todos los casos (n=23, Figura R1C).

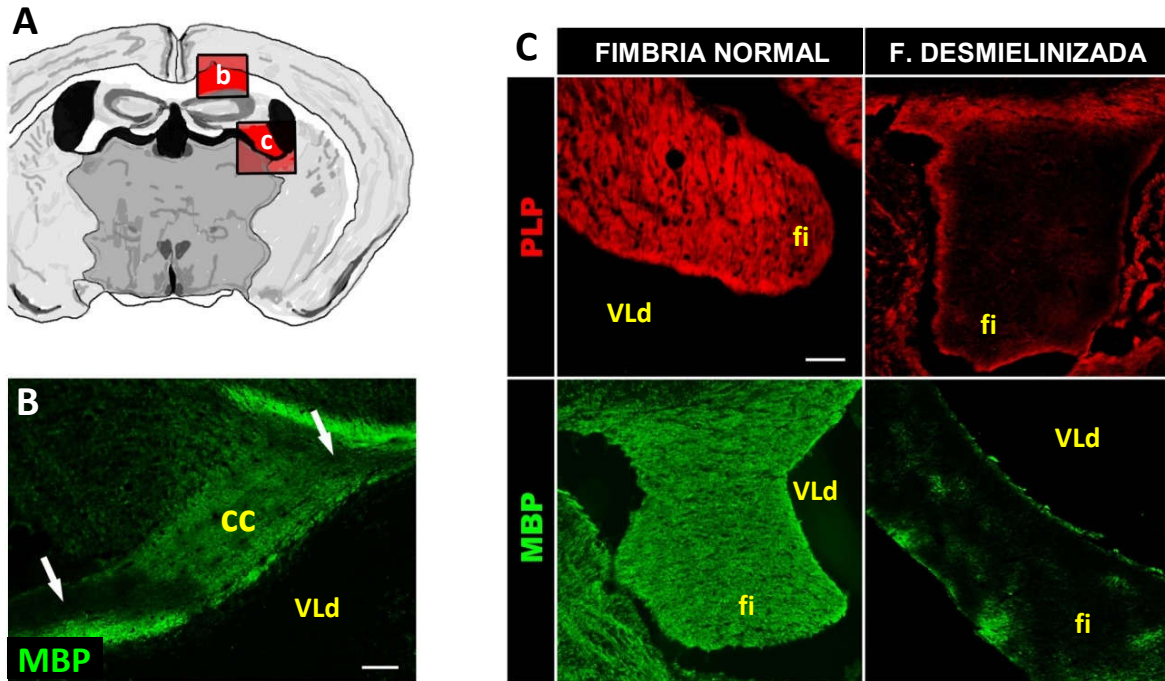


Figura R1: Efecto del tratamiento crónico con cuprizona en el SNC.

(A) Representación esquemática del cuerpo calloso (b) y la fimbria (c) (cuadros rojos) de donde se han tomado las siguientes imágenes:

(B) Sección coronal del cuerpo calloso marcado para MBP (verde) de un ratón tratado durante tres meses con cuprizona. Las flechas señalan parches de desmielinización (ausencia de marcaje MBP), similares a los que aparecen en las lesiones crónicas de esclerosis múltiple.

(C) Resultado del tratamiento crónico con cuprizona en la fimbria y comparación con una fimbria normal. Marcaje de PLP (rojo) y MBP (verde). Obsérvese la pérdida de expresión de las dos proteínas mayoritarias de mielina, objetivando un proceso de desmielinización homogéneo en la fimbria. En la comparativa se han utilizado ratones de la misma edad.

Cc: cuerpo calloso; Fi: fimbria; VLd: ventrículo lateral derecho. Escala: 75 μ m en B, C.

SECCIÓN A:

TRASPLANTE DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE LA MÉDULA ÓSEA.

1.- LAS CÉLULAS MESENQUIMALES TRASPLANTADAS PERMANECEN AGRUPADAS EN EL TEJIDO NERVIOSO DESMIELINIZADO. SON VIABLES Y NO NEUROGÉNICAS A LOS 90 DÍAS DEL TRASPLANTE.

Se trasplantaron 300.000 MSCs resuspendidas en un volumen final de 2 μ l que se obtuvieron de la cepa de ratón transgénico C57Bl/6-Tag (ACT β -EGFP) 10sb/J que presentan el complejo mayor de histocompatibilidad H2D^b. Estas células expresan constitutiva y ubicuamente la proteína verde fluorescente bajo el promotor de la β -actina.

La cirugía se llevó a cabo sobre ratones de la cepa Swiss C3H/He con el complejo mayor de histocompatibilidad H-2 (H2K^k). Estos ratones fueron previamente tratados con cuprizona durante doce semanas. Los trasplantes se realizaron en el área central de la fimbria derecha en las coordenadas mencionadas en el apartado 6.4.2 de Material y Métodos. La fimbria izquierda se utilizó como Control interno del tratamiento desmielinizante. En el grupo Operado Sham se inyectó el mismo volumen de solución vehículo sin células (medio D-MEM sin suero).

90 días después de realizar la cirugía, las MSCs trasplantadas se identificaron mediante su expresión nativa de GFP y su inmunoreactividad para el haplotipo H2D^b.

1.1.- CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LAS MSCs TRASPLANTADAS.

Las células permanecen agrupadas en la zona de inyección con apenas infiltración en el parénquima vecino (Figura R2). Además, no se observan agregados tumorales o malformaciones significativas en la fimbria (Figura R2A).

En el 80% de los casos, se detectan MSCs aisladas de morfología esférica adheridas al plexo coroideo del ventrículo lateral (Figura R2C) procedentes del reflujo celular durante el procedimiento del trasplante.

En la fimbria, las MSCs periféricas del trasplante presentan extensiones citoplasmáticas ramificadas en el interior del parénquima nervioso, mientras que las centrales mantienen una morfología esférica con núcleo central y una relación núcleo-citoplasma cercana a la unidad (Figura R2D y E, respectivamente).

Además, coincidiendo con la presencia de MSCs en el plexo coroideo, también es posible detectar MSCs en áreas más rostrales del sistema ventricular (Figura R3A y C), e integradas en la zona subventricular dorso-lateral en zonas rostrales del ventrículo próximas a la fimbria trasplantada (Figura R3D). En ningún caso se observan MSCs en el ventrículo contralateral al que se realizó la cirugía (Figura R3B).

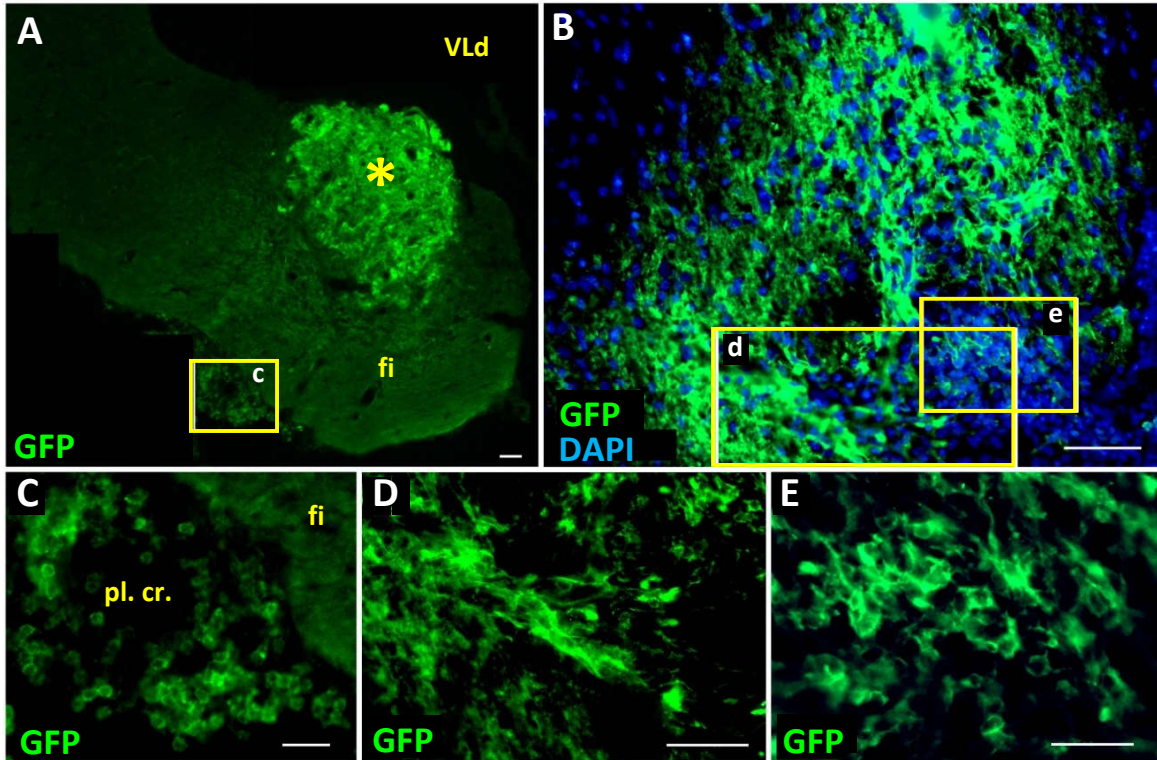
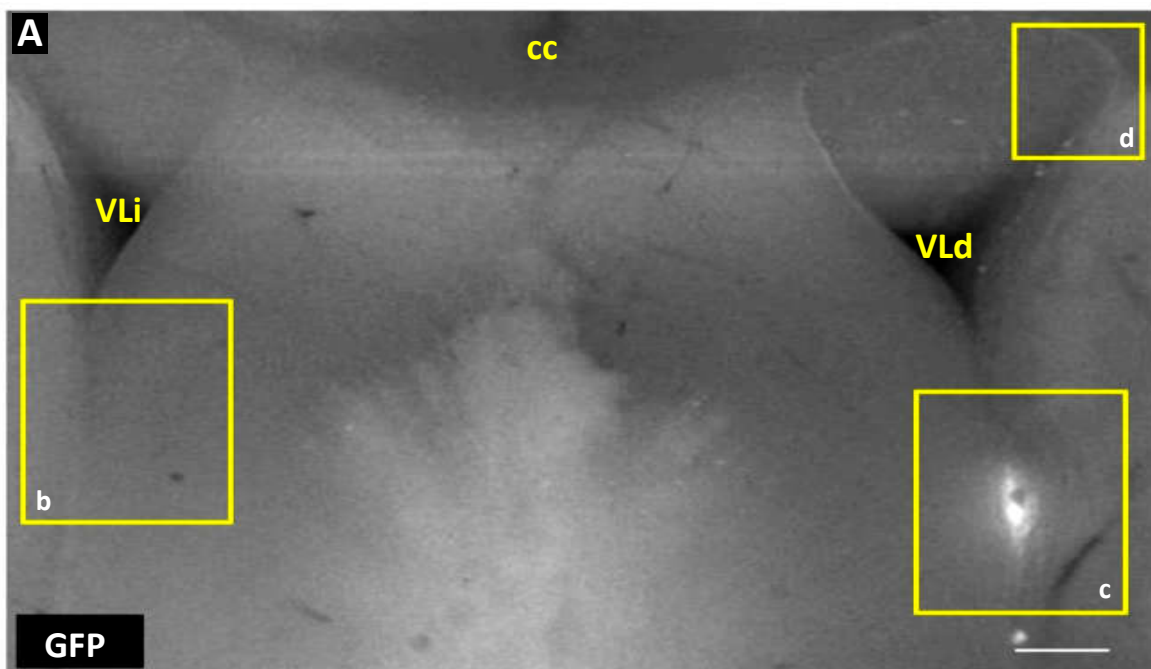


Figura R2: Trasplante de células mesenquimales en la fimbria desmielinizada.

(A) El trasplante (estrella) se localiza en la fimbria donde todas las células permanecen agrupadas sin apenas invasión del tejido huésped. No se observan formaciones tumorales.
(B) Detalle del trasplante de MSCs.
(C) Recuadro en (A) en la que se muestran un grupo de células mesenquimales localizadas en el plexo coroideo.
(D) y (E) Recuadros equivalentes en (B) donde se observan las células trasplantadas agrupadas. Se pueden detectar dos tipos de morfología celular: en la parte periférica del trasplante las células emiten prolongaciones que se entremezclan con el tejido nervioso adyacente (D), mientras que en la zona central del trasplante adoptan una morfología esférica (E).
Fi: fimbria; pl. cr.: plexo coroideo; VLd: ventrículo lateral derecho. Escalas: 50 μ m en A-C; 25 μ m en D, E.



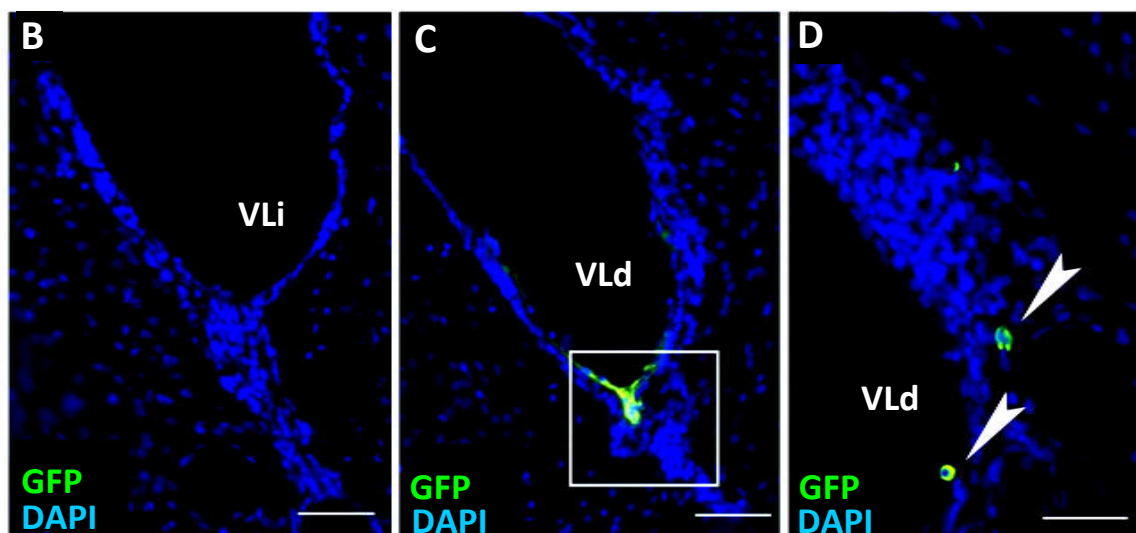


Figura R3 (junto a página anterior): **Las células mesenquimales trasplantadas se pueden detectar en otras áreas anatómicas vinculadas con la fimbria.**

(A) Sección coronal de 0.3 mm de grosor de tejido fresco en la que se observan *in vivo* las MSCs en la zona subependimaria del ventrículo derecho próximas al estriado, rostral a la zona trasplantada. Las MSCs pueden observarse *in vivo* gracias a la expresión intrínseca de GFP.

(B) Sección histológica de 12 μm homóloga al recuadro (b) en (A) mostrando el subependimo ventral contralateral al trasplante donde no existen células trasplantadas.

(C) Sección histológica de 12 μm homóloga al recuadro (c) en (A) mostrando un pequeño grupo de MSCs en el subependimo ventral del ventrículo trasplantado.

(D) Sección histológica de 12 μm homóloga al recuadro (d) en (A) mostrando un pequeño número de células en la zona subventricular del ventrículo trasplantado.

VLd: ventrículo lateral derecho; VLi: ventrículo lateral izquierdo; cc: cuerpo calloso. Escalas: 500 μm en A; 50 μm en B-D.

1.2.- CAPACIDAD NEUROGÉNICA DE LAS MSCs.

Para averiguar si las MSCs integradas en el tejido poseen características neurogénicas, se diseccionó la zona subependimaria donde se han acumulado algunas de las MSCs trasplantadas (recuadro blanco en Figura R3C) y se cultivó en medio neurogénico.

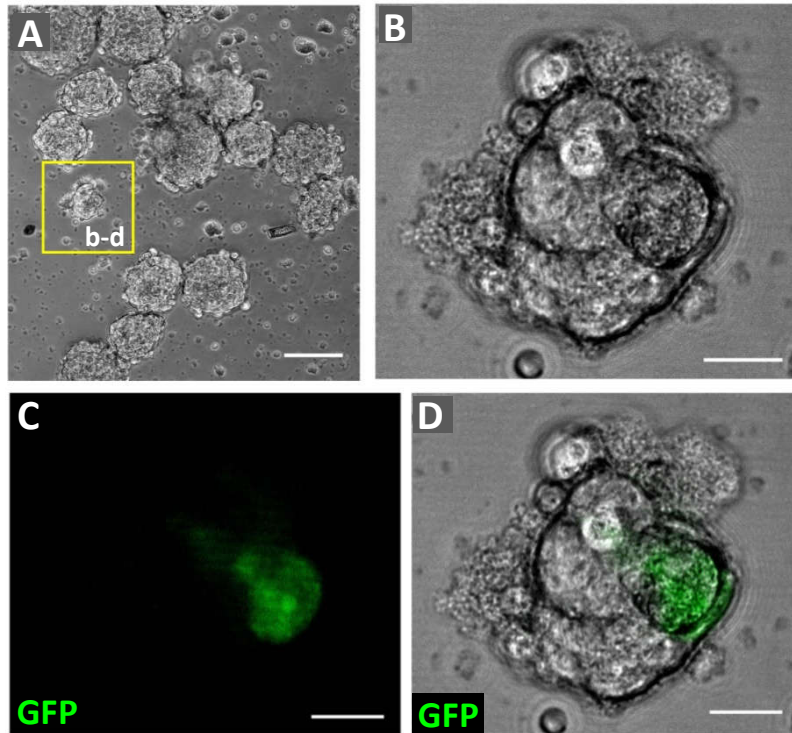
Al cabo de una semana se obtuvieron neuroesferas primarias donde el 4% de ellas eran quiméricas conteniendo una o dos células GFP. Ninguna de ellas estaba constituida completamente por células GFP, sugiriendo que las MSCs trasplantadas no se transdiferencian en células madre neurales capaces de formar neuroesferas. Además, éstas células GFP se perdieron en la obtención de neuroesferas secundarias (Figura R4A-D).

Figura R4 (página siguiente): **Análisis de la capacidad neurogénica de las MSCs.**

(A) Cultivo primario de neuroesferas obtenidas de homogeneizados de la región remarcada en la figura R3C.

(C-E) Imagen ampliada de la neuroesfera remarcada en amarillo en (A). Bajo luz fluorescente (C) se observa una célula madre mesenquimal que expresa GFP adherida a una célula con capacidad de formación de neuroesferas.

Escala: 50 μm en A; 10 μm en B-D.



1.3.- VIABILIDAD DE LAS MSCs TRASPLANTADAS.

Las MSCs trasplantadas en la fimbria expresan c-fos, un factor de transcripción de genes de expresión rápida ante estímulos de factores de crecimiento (Figura R5A). Además, las MSCs no presentan actividad proliferativa dentro del parénquima por la ausencia de expresión de Ki67 propia de células que se encuentran en la fase G0 del ciclo celular. Sin embargo, se han observado algunas células periféricas al trasplante NG2+ (2-4 células dispersas en cada sección) que presentan inmunorreactividad para este marcador (Figura R5B-D).

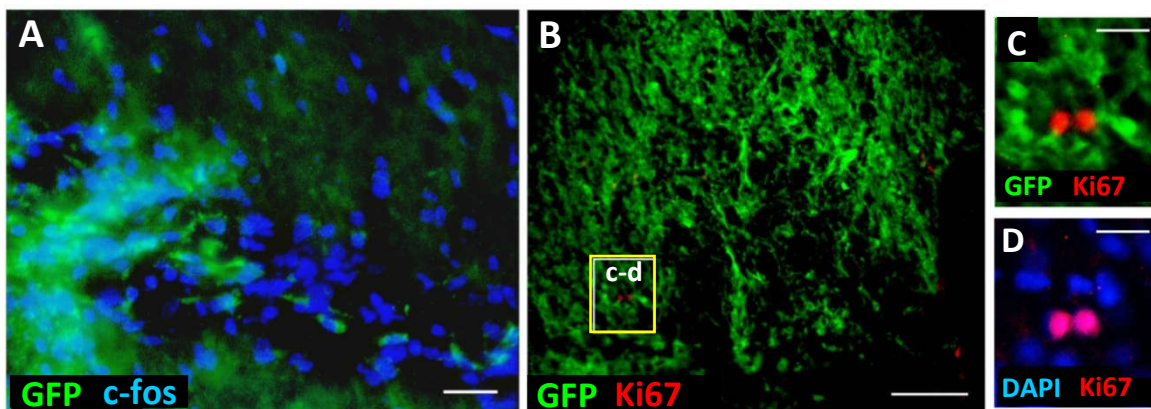


Figura R5: Viabilidad de las células trasplantadas I.

(A) Detalle de la zona central del trasplante de MSC transcripcionalmente activa para c-fos.
(B) Trasplante de MSCs donde se observa escasa proliferación celular (Ki67) en la periferia del trasplante.
(C, D) Detalle del recuadro en (B). Obsérvese que ésta proliferación no es propia de las células trasplantadas (verde). Se muestra Ki67 (rojo) y en azul el ADN nuclear. Escala: 10 µm en A, C y D; 25 µm en B.

Adicionalmente, para comprobar la viabilidad de las células trasplantadas tras 90 días en el SNC, se extrajo la fimbria y se cultivó en medio específico de MSC. Tras una semana en cultivo se aislaron células viables que expresan GFP con morfología de células mesenquimales (Figura R6A-C).

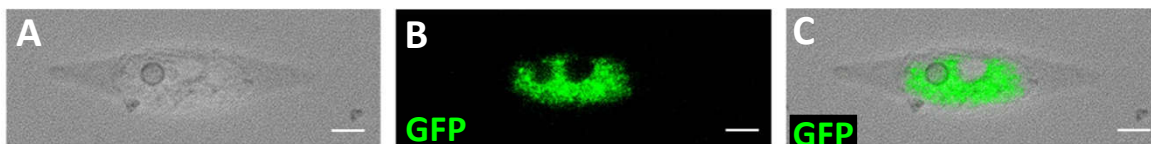


Figura R6: Viabilidad de las células trasplantadas II.

(A-C) Imagen in vivo de una MSC en cultivo estándar para este tipo celular, recuperada de la fimbria 90 días después de haber sido trasplantada en el SNC. La célula mantiene su fenotipo normal y sigue expresando GFP.
Escala: 10 μ m.

2.- EL TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ACTIVA LA OLIGODENDROGÉNESIS Y REMIELINIZACIÓN ENDÓGENA EN LA PERIFERIA DEL TRASPLANTE.

2.1.- ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS DE OLIGODENDROCITOS.

90 días después de haber realizado el trasplante de MSCs se observan células progenitoras de oligodendrocitos (CPOs) que expresan de forma característica el proteínglicano NG2 en su membrana. Igualmente se observan oligodendrocitos maduros que expresan MBP. Éstas células se extienden 100 μ m rostral y caudal al trasplante (Figura R7A y B) formando una densa maraña alrededor de él sin llegar a invadir sus zonas centrales. Las prolongaciones citoplasmáticas de las CPO se mantienen en aparente contacto con las extensiones citoplasmáticas de las MSCs periféricas (Figura R7C-H y R8). Esta reacción puede observarse incluso a los 15 días tras haber realizado el trasplante.

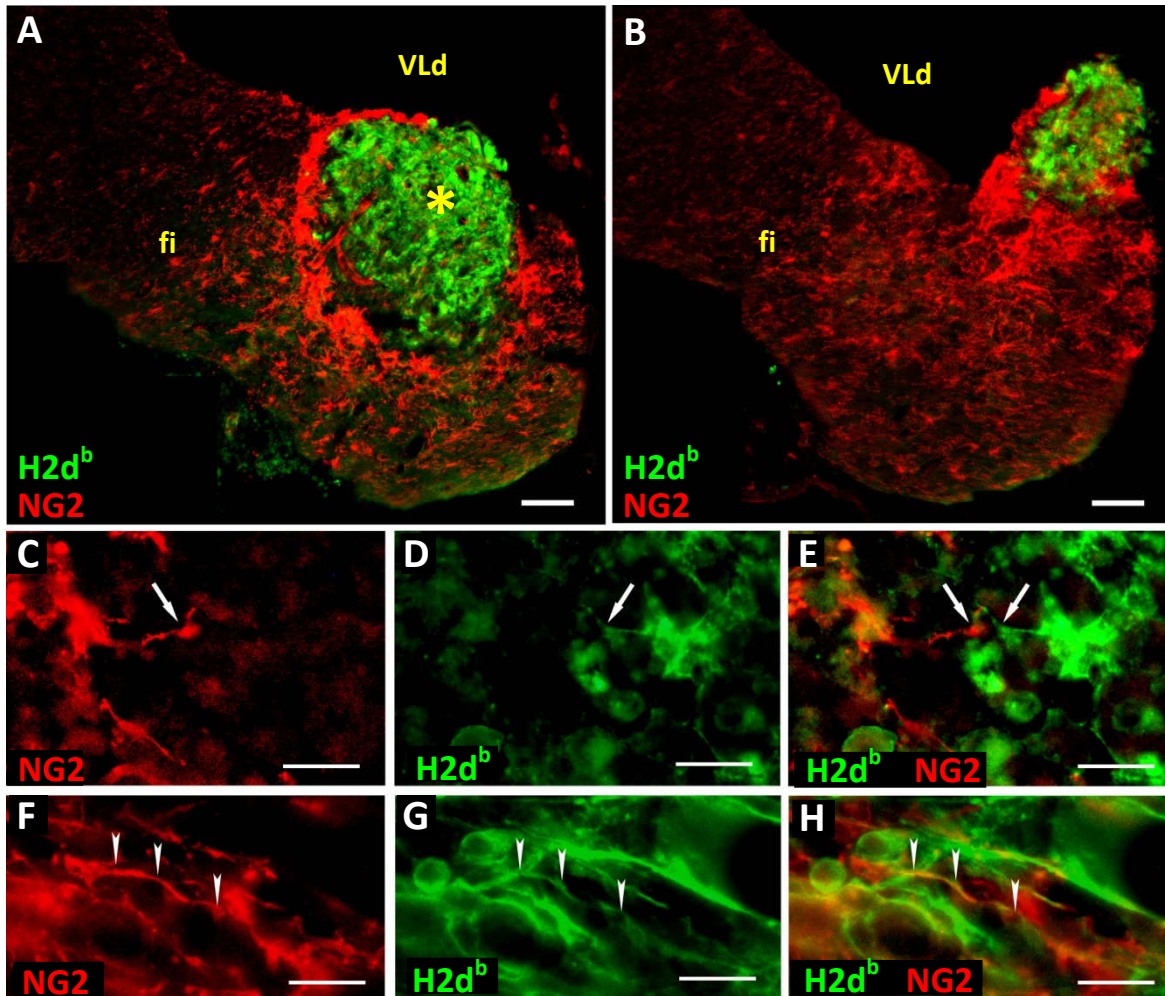
Figura R7 (página siguiente): Colonización de CPO alrededor del trasplante I.

(A) Fimbria trasplantada marcada frente H2d^b (verde) y NG2 (rojo). La imagen ha sido tomada en el lugar del trasplante (estrella).

(B) Imagen tomada 500 μ m rostral al lugar de inyección mostrado en A. Las CPO (identificadas por el marcaje en rojo de NG2) siguen estando presentes en el parénquima de la fimbria trasplantada.

(C-E) y (F-H) Detalle a gran escala de la periferia del trasplante. Las flechas o cabezas de flechas señalan prolongaciones citoplasmáticas de las CPOs propias del huésped y las prolongaciones de las MSCs trasplantadas. Pueden observarse los contactos físicos que se establecen entre ambos tipos celulares (E y H).

fi: fimbria; VLd: ventrículo lateral derecho. Escala: 100 μ m en A, B; 10 μ m en C-H.

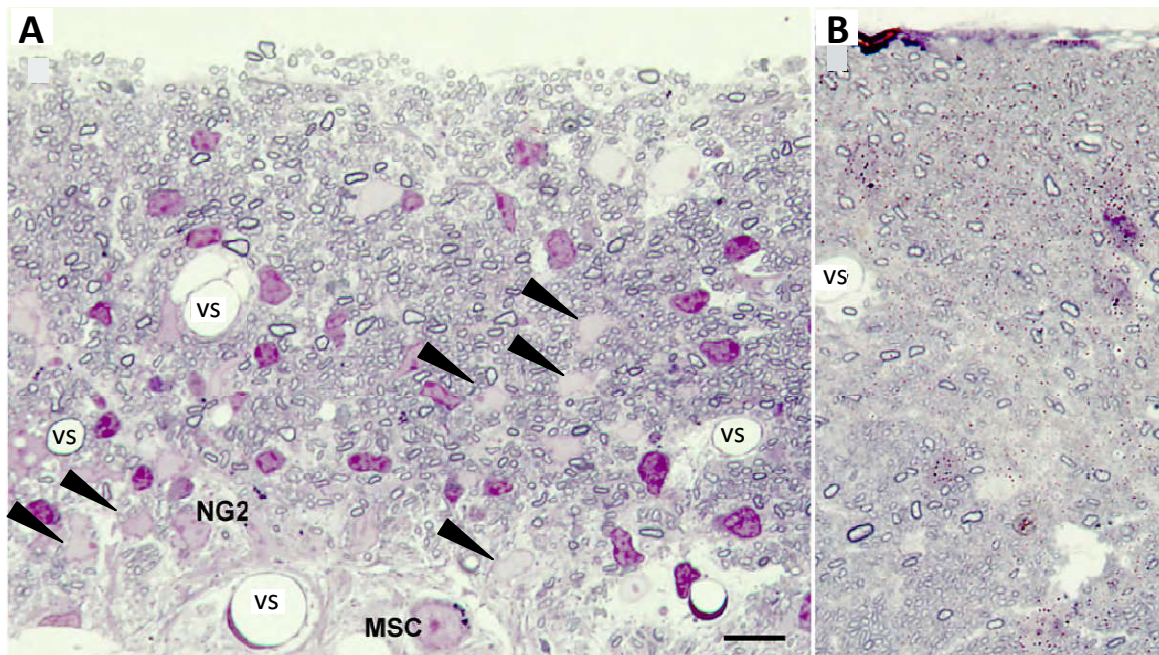


El número de CPO en la fimbria del grupo Trasplantado con MSCs es 14 veces superior a su grupo Control (control endógeno de desmielinización; ver apartado 1.2.C de Material y Métodos), mientras que en el grupo Operado Sham el incremento es 2.5 veces mayor sobre su grupo control. Esto significa que el trasplante de MSC incrementa la respuesta de CPO siete veces ($t=3.19$; p valor=0.013), respecto al Operado Sham (Figura R9): Operado MSCs $5.23\% \pm 1.12$ ($n=10$); Control operado MSC $0.37\% \pm 0.09$ ($n=10$); Operado Sham $0.72\% \pm 0.17$ ($n=4$); Control operado sham $0.28\% \pm 0.07$ ($n=4$).

Figura R8 (página siguiente): **Colonización de CPOs alrededor del trasplante II.**

(A) Secciones de ultramicrotomo de la fimbria trasplantada con MSCs. Los núcleos de las CPOs se tiñen en rosa pálido (puntas de flecha), mientras que los núcleos de los oligodendrocitos maduros se tiñen en morado. Obsérvese la mayor compactación de la cromatina en éstos últimos. En la parte inferior de la imagen puede observarse una célula mesenquimal con un gran núcleo de cromatina laxa, reflejo de su alta actividad transcripcional con nucléolo central.
(B) Fimbria Operada Sham en la que apenas aparecen CPOs.

MSC: célula madre mesenquimal; vs: vaso sanguíneo. Escala: 5 μ m.



Olig2 es un factor de transcripción implicado en el proceso de maduración de CPOs a oligodendrocitos maduros. Su expresión, cuantificada mediante PCR a tiempo real, se incrementa un $458\% \pm 61$ en una fimbria trasplantada con MSCs ($n=5$) respecto al grupo Normal (no tratado y no desmielinizado), mientras que en los grupos Control de desmielinización se incrementa el $170\% \pm 16$ ($n=8$) y en el Operado Sham el $140\% \pm 23$ ($n=3$), (Figura R9E). Esto significa que el trasplante de MSC estimula la maduración de oligodendrocitos 3 veces más ($t=2.92$; p valor= 0.027), siendo no significativas las diferencias entre los grupos Operado Sham y Control.

Mediante PCR convencional se comprobó que en el momento del trasplante las MSCs no expresaban el factor de transcripción Olig2 ni el proteoglicano NG2 (ver apartado 4 de Resultados). Además, inmunohistoquímicamente se ha descartado la presencia de células NG2+/GFP+ y Olig2+/GFP+ en el trasplante. Estos resultados sugieren la ausencia de transdiferenciación de MSCs a CPOs, por lo que se puede afirmar que el incremento de éstos en la fimbria trasplantada se debe a la propia actividad regenerativa del tejido neural del animal trasplantado.

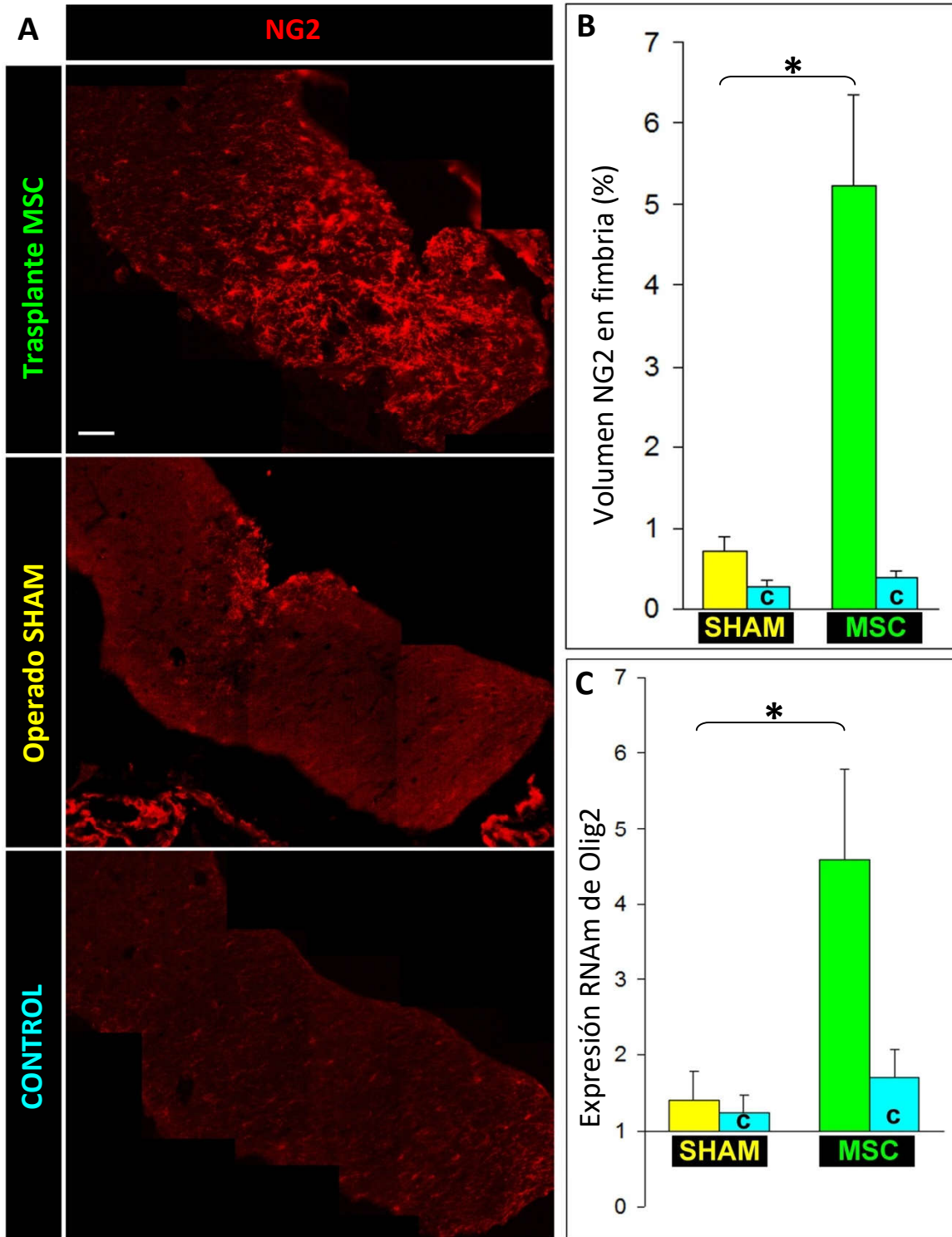


Figura R9: Cuantificación de la expresión de NG2 en la fimbria del grupo trasplantado con MSCs (barra verde); grupo Operado Sham (barra amarilla); y sus respectivos Controles (barra azul).

(A) La imagen mostrada del grupo trasplantado con MSCs se ha tomado 1mm rostralmente al trasplante y no se observan MSCs.

(B) Hay un incremento significativo de la expresión de NG2 en la fimbria trasplantada comparado con el grupo Operado Sham ($t=3.19$; p valor=0.013), mientras que no se observan diferencias entre los Controles de ambos grupos.

(C) Cuantificación de Olig2 mediante PCR a tiempo real en la fimbria del grupo trasplantado con MSCs (barra verde); Operado Sham (barra amarilla); y sus respectivos Controles (barra azul). Todos los grupos se han estandarizado respecto al valor de una fimbria normal (valor=1) y el valor de expresión de β -actina como control endógeno. Escala: 100 μ m. * p <0.05.

2.2.- ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE LA REACCIÓN ASTROGLIAL.

Igualmente se cuantificó la reacción astroglial mediante inmunodetección de GFAP siendo 1.6 veces mayor ($t=2.60$; $p \text{ valor}=0.032$), en la periferia del trasplante de MSCs respecto al grupo Operado Sham (Figura R10) Trasplantado MSCs $2.93\% \pm 0.79$ ($n=10$); Operado Sham $1.82\% \pm 0.34$ ($n=4$). Sin embargo, también encontramos astrogliosis en las fimbrias Controles así como en otras áreas desmielinizadas de sustancia blanca, sugiriendo la presencia de gliosis reactiva a la desmielinización: Control del grupo operado con MSC $1.87\% \pm 0.28$ ($n=10$); Control del operado sham $1.06\% \pm 0.20$ ($n=4$).

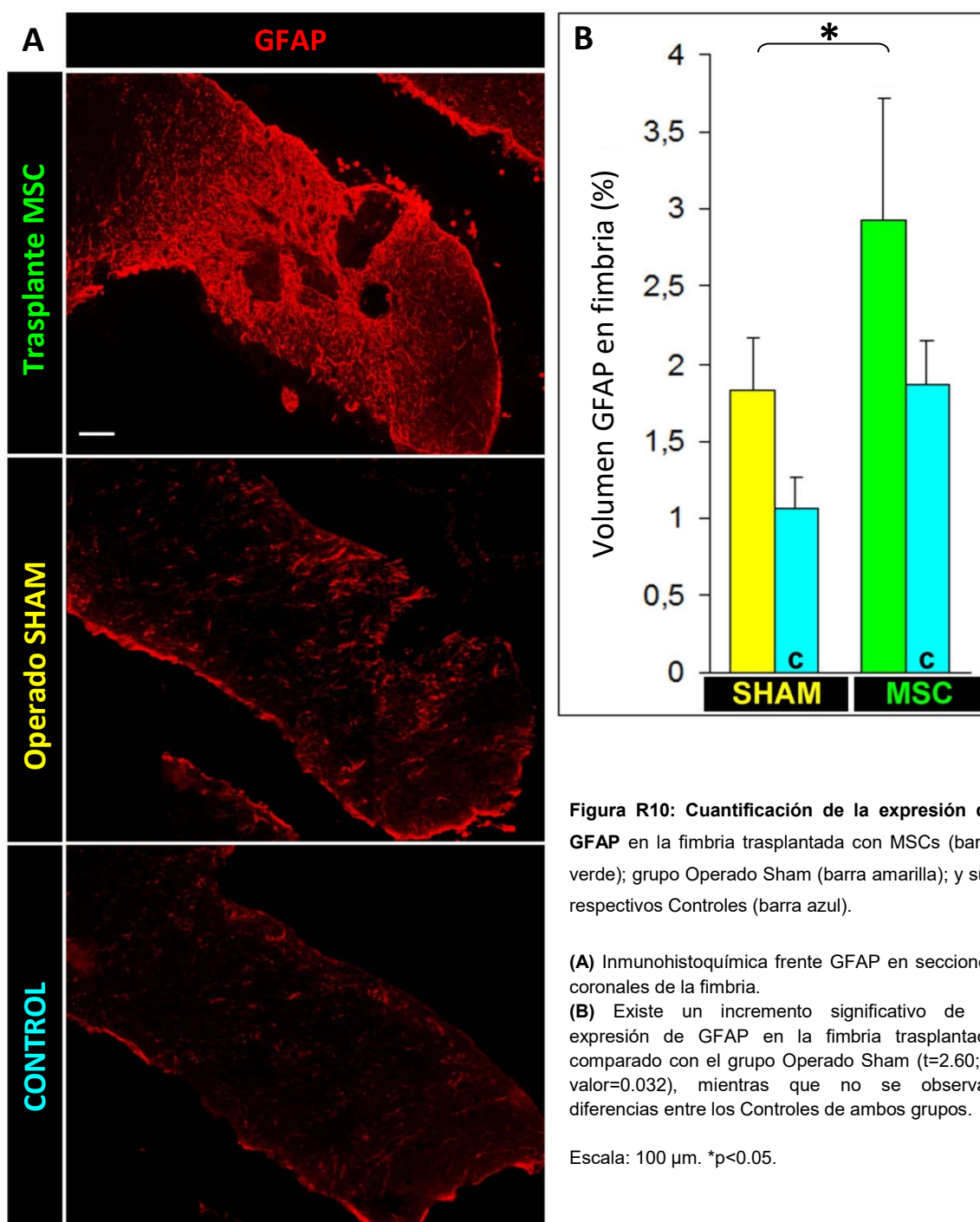


Figura R10: Cuantificación de la expresión de GFAP en la fimbria trasplantada con MSCs (barra verde); grupo Operado Sham (barra amarilla); y sus respectivos Controles (barra azul).

(A) Inmunohistoquímica frente GFAP en secciones coronales de la fimbria.

(B) Existe un incremento significativo de la expresión de GFAP en la fimbria trasplantada comparado con el grupo Operado Sham ($t=2.60$; $p \text{ valor}=0.032$), mientras que no se observan diferencias entre los Controles de ambos grupos.

Escala: 100 μm . * $p < 0.05$.

2.3.- ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MIELINA.

En concordancia al incremento en el número de CPO, es posible detectar proteínas de mielina (PLP y MBP) en las regiones periféricas al trasplante de MSCs. Este hecho se observó en todos los animales del grupo trasplantado. La producción de mielina se extiende cubriendo prácticamente toda la superficie de la fimbria a lo largo de 100 μm anterior y posterior al trasplante (Figura R11).

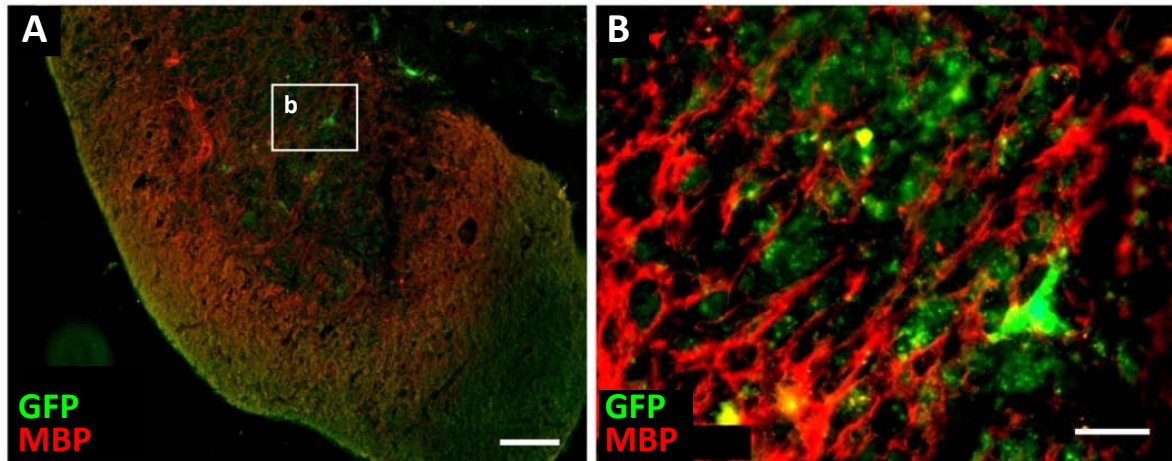


Figura R11: Formación de mielina en la periferia del trasplante de MSCs.

(A) Fimbria trasplantada con MSCs (verde) en la que se muestra la formación de MBP (rojo).

(B) Detalle de la periferia del trasplante (recuadro en A) donde pueden verse las MSCs entremezcladas con las fibras mielinizadas.

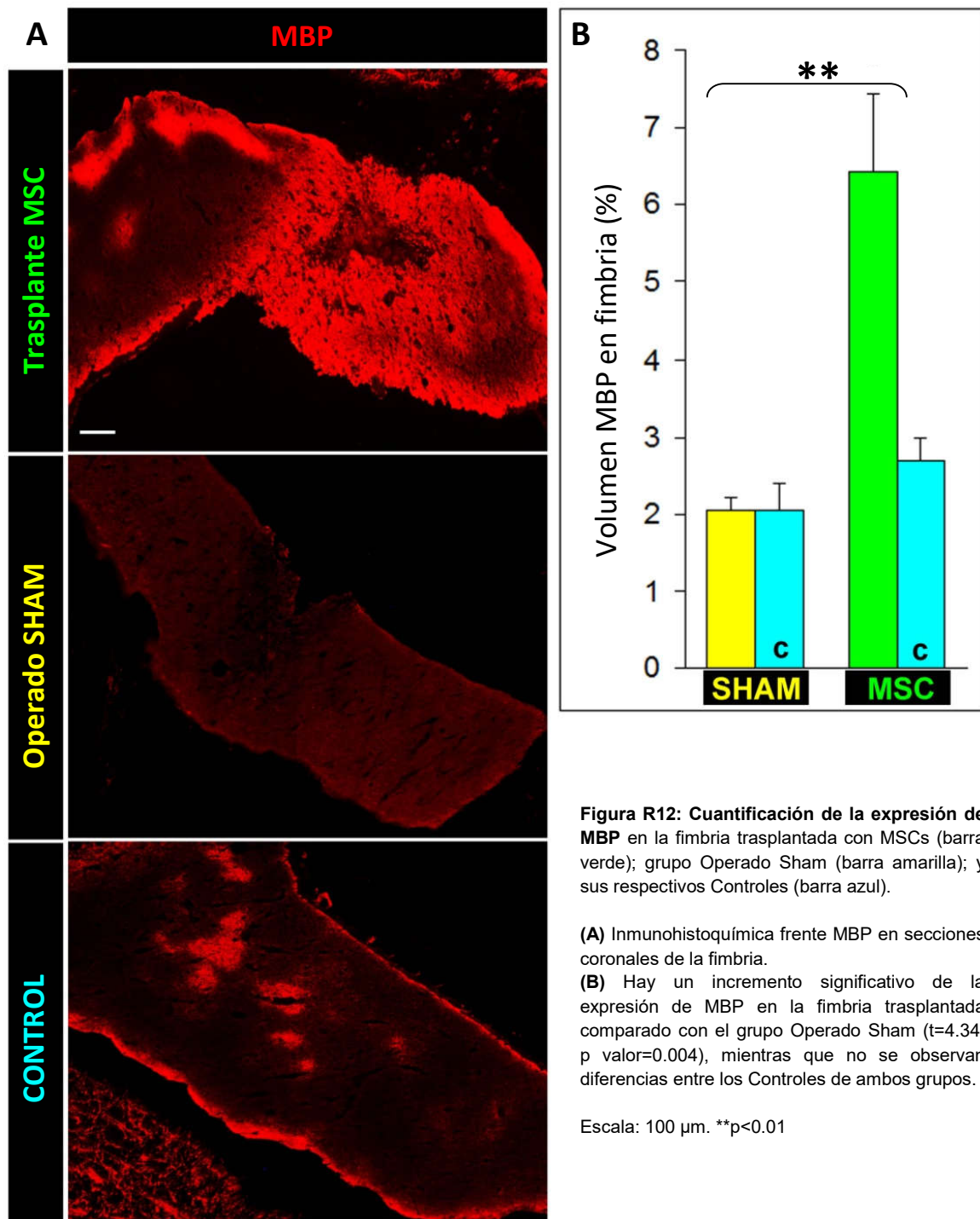
Escala: 100 μm en A; 25 μm en B.

Los valores de remielinización obtenidos mediante el trasplante de MSC son 3 veces mayor respecto al grupo Operado Sham ($t=4.34$; p valor=0.004) y 2 veces mayor respecto al grupo Control. Sin embargo, la expresión de MBP es mucho más intensa en la periferia del trasplante coincidiendo con la zona donde se ha contabilizado un mayor número de CPOs y decrece gradualmente en áreas más alejadas del mismo, por lo que las diferencias en la cuantificación de MBP serían aun mayores si únicamente se cuantificara esta zona.

Al comparar los valores de MBP en el grupo Operado Sham y Control de desmielinización no se observan diferencias significativas. Los bajos valores de MBP en los Controles de desmielinización indican a su vez, que no hay remielinización espontánea en la fimbria. (Figura R12): Grupo trasplantado con MSCs $6.43 \pm 0.99\%$ ($n=10$); Control operado MSC $2.68 \pm 0.31\%$ ($n=10$); grupo Operado Sham $2.04 \pm 0.17\%$ ($n=4$); Control operado sham $2.05 \pm 0.37\%$ ($n=4$).

Esto significa que pese al aumento de CPO observado en el grupo Operado Sham, no se diferencian a oligodendrocitos maduros capaces de sintetizar mielina, posiblemente debido a la ausencia de señales activadoras que promuevan su diferenciación, y sugiriendo que

posiblemente éstas CPOs desaparezcan, permanezcan indiferenciadas o se diferencien a astrocitos (otra posible vía de maduración de las CPO).



2.4.- ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE TRANSDIFERENCIACIÓN.

En el conjunto de animales trasplantados con MSCs aparecieron un pequeño número de células trasplantadas (GFP+ y/o H2D^b+) que expresaban marcadores oligodendrogiales como PLP o MBP en varias localizaciones:

- En todos los animales trasplantados con MSCs, se localizó una única célula binucleada en el córtex de uno de los animales que expresaba tanto GFP como MBP, posiblemente fruto de una fusión celular entre una MSC trasplantada y un oligodendrocito endógeno (Figura R13 A-C).
- Entremezcladas entre el epitelio de los plexos coroideos se contabilizaron 3 ± 1 células con doble marcaje MBP-GFP frente a 7 ± 3 células donantes (Figura R13 D-F).
- En el trayecto intraparénquima de la inyección se observaron 3 ± 1 células con marcaje doble frente a 25 ± 5 células donantes (Figura R13H, I).

Por este motivo se intentó averiguar el potencial de transdiferenciación de las MSCs a células productoras de mielina en tejido nervioso desmielinizado y cómo este suceso contribuye por sí mismo a la remielinización observada en el grupo trasplantado.

Para tal fin se trasplantaron (n=4) MSCs obtenidas de la médula ósea de ratones PLP-GFP donde la proteína verde fluorescente se expresa bajo el control del promotor plp/dm20. De este modo, cualquier célula trasplantada que active el promotor de síntesis de la proteína de mielina PLP, expresará también GFP y se detectará por su autofluorescencia verde. Esto significa que si en la fimbria aparecen MSCs PLP-GFP trasplantadas con capacidad de expresar GFP, puede sugerir una posible transdiferenciación de las MSCs a células productoras de mielina.

Sin embargo, el incremento en la expresión de PLP en la periferia al trasplante es propio del tejido nervioso del animal trasplantado, sin observarse una presencia significativa de expresión de GFP que provenga de las MSCs PLP-GFP. Sin embargo se contabilizan dos únicas células en solo un caso de los cuatro trasplantados, con fluorescencia intrínseca verde (GFP-PLP) y que expresa PLP corroborado mediante inmunomarcaje (Figura R13 K-N).

De este modo queda demostrado que en éste sistema experimental, la fusión o la transdiferenciación celular es un fenómeno raro que no es responsable de la abundante formación de mielina en las zonas periféricas al trasplante.

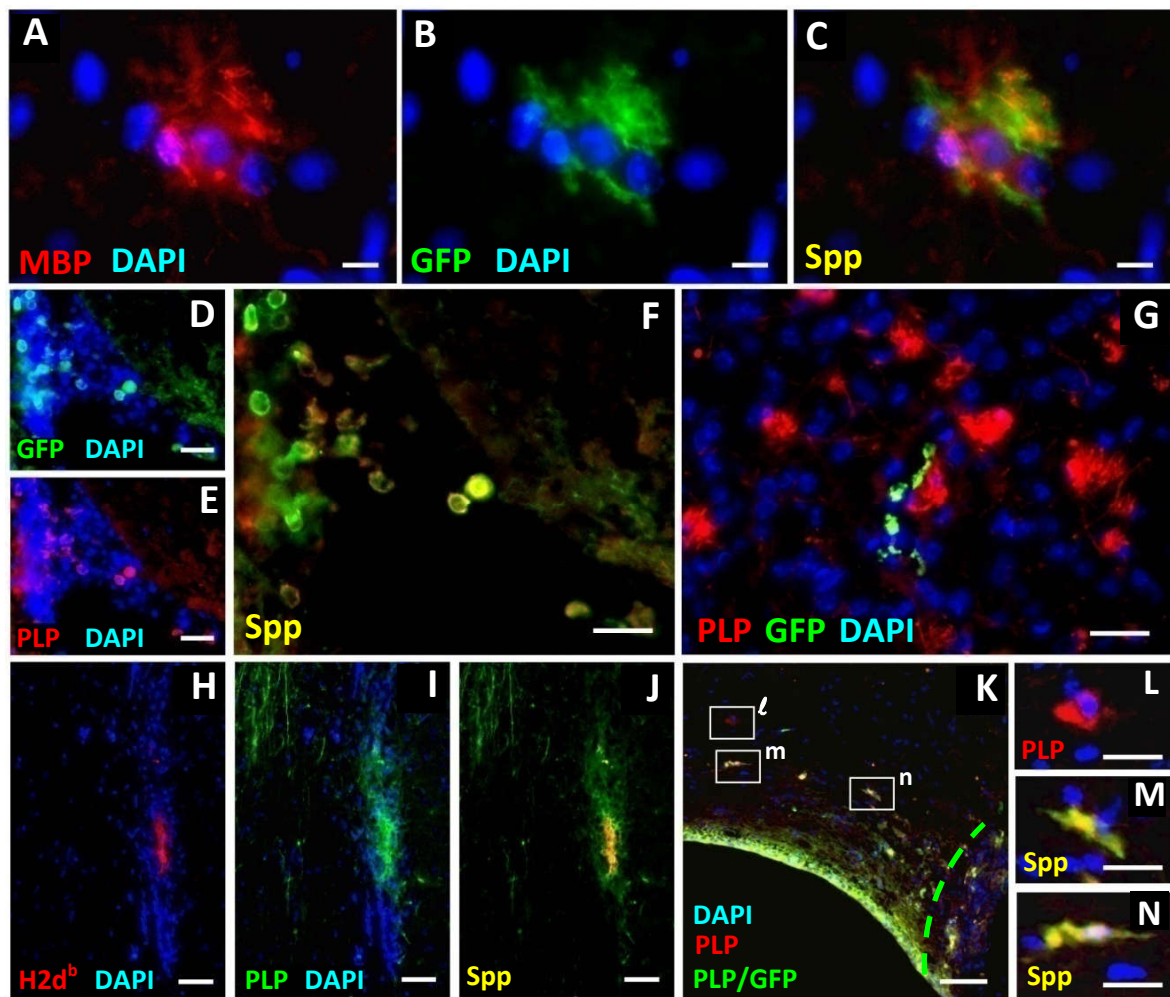


Figura R13: Potencial de transdiferenciación de las MSCs.

(A-C): Célula aislada con dos núcleos que expresa MBP (rojo) y GFP (verde). Esta célula se detectó en córtex, posiblemente debido a un evento de fusión celular.

(D-F): MSCs (verde) atrapadas en los plexos coroideos del ventrículo lateral adyacentes a la fimbria trasplantada que expresan PLP.

(G): Control de la inmunorreacción para descartar posibles reacciones cruzadas y solapamiento de canales de emisión de fluorescencia: MSC (verde) en contacto con un oligodendrocito maduro que expresa PLP (rojo).

(H-J): Células trasplantadas en la trayectoria de inyección identificadas por inmunomarcaje del haplotipo H2d^b (rojo) en las que algunas de ellas expresan PLP (verde).

(K-N): Trasplante en la fimbria de MSCs obtenidas de la médula ósea de un ratón GFP/PLP-dm20 (línea verde discontinua). Los recuadros muestran una célula control en el cuerpo calloso que únicamente expresa PLP (L), y dos células (m y n) doblemente positiva para GFP/PLP-dm20 (fluorescencia intrínseca verde) y PLP (inmuno fluorescencia roja).

Escala: 5 μ m en A-C; 25 μ m en D-J y L-N; 100 μ m en K. Spp: superposición canal verde y canal rojo.

3.- EL TRASPLANTE DE MSCs AUMENTA LA VELOCIDAD DE CONDUCCIÓN EN LAS FIBRAS DESMIELINIZADAS.

3.1.- VELOCIDAD DE CONDUCCIÓN.

Para comprobar que la mielina regenerada en la periferia del trasplante es funcional, se midió la velocidad de conducción de los axones que discurren cercanos al trasplante, lugar donde la expresión de MBP y PLP es máxima (ver apartado material y métodos).

En los registros obtenidos con electrodos localizados en la periferia del trasplante en fimbrias experimentales o zonas equivalentes en el resto de los grupos control, se identificaron electrofisiológicamente dos poblaciones diferentes de axones que corresponden a fibras de conducción rápida y lenta (Figura R14A). En un ratón Normal no desmielinizado la velocidad de conducción media de estos componentes es de 1 y 0.4 m/s respectivamente (a temperatura ambiente).

El impulso correspondiente a las fibras de conducción lenta desaparece si el registro se realiza en la zona de la fimbria más cercana al hipocampo (Figura R14B), sugiriendo que en dicha zona únicamente hay fibras de conducción rápida, o en el supuesto que sí las hubiera, dichas fibras de conducción lenta no transcurrirían por la fimbria caudal, lugar donde se realizan los estímulos.

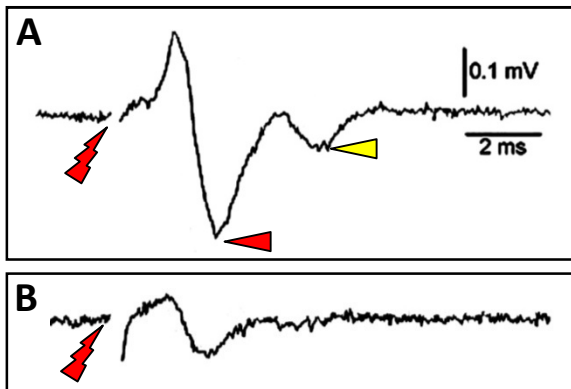


Figura R14: Patrón electrofisiológico de la fimbria.

(A): Se detectaron dos tipos de fibras: rápidas (punta de flecha roja) y lentas (punta de flecha amarilla).

(B): Si el estímulo se realiza cercano al hipocampo, desaparece el registro de las fibras de conducción lenta.

En el eje vertical se representa la amplitud de voltaje detectado en milivoltios. En el eje horizontal el tiempo en milisegundos. La flecha quebrada indica el momento en el que se produjo el estímulo.

Los registros de velocidad de conducción obtenidos para los diferentes grupos experimentales se representan en la figura R15 para las fibras de conducción rápidas (R15A) y para las lentas (R15B). Los axones del grupo Normal (línea y barra negra) presentan una velocidad media de conducción del impulso nervioso próxima a 1m/s para las fibras de conducción rápidas y 0.4m/s para las fibras de conducción lenta (n=7).

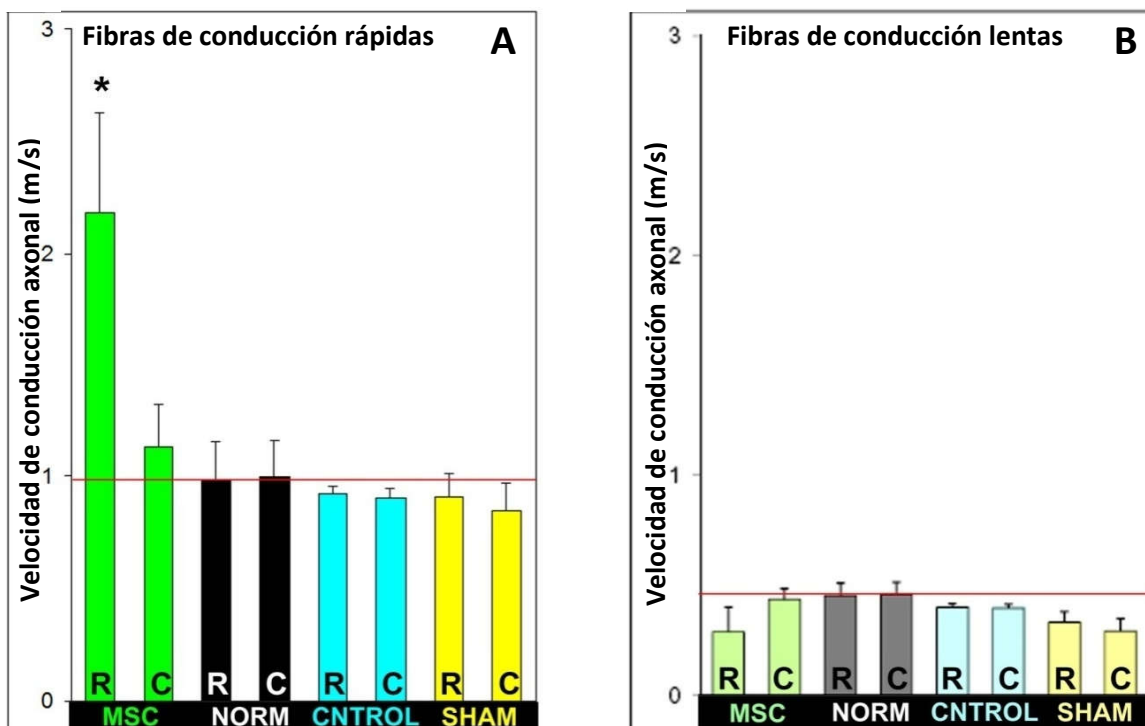
No existen diferencias significativas entre la velocidad de conducción del grupo Control (barras azules) y Operado Sham (barras amarillas), en relación al grupo Normal (línea y barra negra).

Además, en todas las regiones de la fimbria analizadas, dentro de los grupos Normal, Control y Operado Sham, la velocidad de conducción es similar. Por este motivo solo se muestran (Figura R15) los valores obtenidos en las regiones Rostral (R) y Caudal (C).

Sin embargo, en el grupo trasplantado con MSCs (línea y barra verdes), la velocidad de conducción de las fibras de conducción rápida de la zona rostral de la fimbria, más cercanas a la comisura del fórnix y donde la intensidad de inmunomarcaje de proteínas de mielina es mayor (ver apartado 5.2), se incrementa hasta 2.4 veces ($t=3.67$; p valor=0.004) respecto a lo observado en los grupos Control, Operado Sham y curiosamente, también el grupo Normal (Figura R15A): Barra verde "R": 2.20 ± 0.44 m/s ($n=8$) vs 0.91 ± 0.10 m/s en el grupo Operado Sham ($n=3$).

En la zona caudal de la fimbria trasplantada con MSC, la velocidad de conducción también se ve incrementada respecto a los otros grupos, aunque no de forma estadísticamente significativa: 1.13 ± 0.19 m/s ($n=8$) vs 0.85 ± 0.12 m/s en el grupo Operado Sham ($n=3$).

La velocidad de conducción de las fibras de conducción lenta (Figura R15B) no presenta variaciones en ninguna condición experimental, sugiriendo que estas fibras no ven alterado su patrón de conducción tras el trasplante, bien porque fisiológicamente son fibras amielínicas, o bien porque no han sido remielinizadas tras el trasplante.



◀ **Figura R15** (página anterior): **Velocidad de conducción del potencial de acción axonal II.**

(A) Histograma que representa la velocidad de conducción de las fibras rápidas en el grupo Trasplantado con MSCs (barra verde), Normal (barra negra), Control (barra azul), y Operado Sham (barra amarilla) en regiones de la fimbria rostral (R) o caudal (C) al trasplante. La línea roja marca el valor del grupo normal (1 m/s las fibras de conducción rápida y 0.4 m/s las lentas).
(B): velocidad de conducción de las fibras lentas.

3.2.- ALTERACIONES ESTRUCTURALES AXONALES.

Teniendo en cuenta que la velocidad de conducción de un axón viene determinado por el grosor de la vaina de mielina y el diámetro axonal, se midieron estos parámetros en la zona periférica al trasplante. De esta forma se pretende averiguar por qué se incrementa la velocidad de conducción en el grupo Trasplantado con MSCs a valores que llegan a ser superiores incluso que la velocidad de conducción normal y del mismo modo, obtener respuesta a por qué el tratamiento desmielinizante con cuprizona apenas varía la velocidad de conducción respecto a la normal, al menos en nuestras condiciones experimentales o temporo-espaciales.

Para ello se cuantificó el diámetro axonal y el grosor de la vaina de mielina en el grupo Trasplantado con MSCs o región equivalente en los restantes grupos y los valores obtenidos fueron comparados con el grupo Normal.

3.2.1.- DIAMETRO AXONAL.

El diámetro axonal se incrementa un $17.05\% \pm 0.31$ en el grupo Control respecto al grupo Normal debido posiblemente a la afectación del tratamiento desmielinizante. En el grupo Operado Sham el diámetro se incrementa significativamente hasta el $50.46\% \pm 5.78$ ($t=2.85$; p valor= 0.046) respecto al grupo Normal, ya que en este caso el proceso desmielinizante se ve agravado por las lesiones inducidas en el procedimiento quirúrgico. De forma similar, en el grupo trasplantado con MSCs el diámetro axonal es $29.93\% \pm 0.19$ ($t=4.66$; p valor= 0.002) superior al Normal (Figura R16 A-E): Trasplantado con MSC: 18.15 ± 0.30 ; Operado Sham: 21.01 ± 4.81 ; Control 16.35 ± 0.69 ; Normal: 13.97 ± 1.65 .

Estos resultados indican que las fibras que han recibido un tratamiento desmielinizante y posteriormente una lesión quirúrgica tienden a tener un diámetro mayor, aunque este incremento no es estadísticamente significativo comparando el grupo Operado Sham con el grupo Control ($t=2.85$; p valor= 0.056).

3.2.2.- GROSOR DE LA VAINA DE MIELINA.

Por otro lado, en el grupo Control y Operado Sham, el grosor de la vaina de mielina disminuye un $-14.13\% \pm 0.27$ y un $-22.44\% \pm 0.25$ respectivamente, mostrando que efectivamente, el

tratamiento con cuprizona afecta al grosor de la vaina de mielina estadísticamente significativo ($t=-25.71$; p valor=0.0002). No existen diferencias significativas entre los grupo Operado Sham y Control ($t=2.22$; p valor=0.077)

Sin embargo, en el grupo trasplantado con MSCs el grosor de la vaina de mielina no solo recupera los valores normales sino que se ve incrementado un $+2.90\% \pm 0.04$ respecto a los valores Normales ($t=0.53$; p valor=0.61), (Figura R16 A-D y F): Trasplantado con MSC: 7.02 ± 0.28 ; Operado Sham: 5.29 ± 0.12 ; Control 5.86 ± 0.25 ; Normal: 6.82 ± 0.07 .

3.2.3.- G-RATIO.

El G-ratio es un índice de correlación entre el diámetro axonal y el grosor de la vaina de mielina (Chomiak & Hu, 2009). Este valor se incrementa en los tres grupos respecto a los valores normales (Figura R16G): Trasplantado con MSC: 2.60 ± 0.08 ; Operado Sham: 3.98 ± 0.99 ; Control 2.81 ± 0.19 ; Normal: 2.05 ± 0.26 .

Pese a tener diámetros axonales similares, el menor grosor de la vaina de mielina del grupo Operado Sham respecto al grupo Trasplantado con MSC, explica el mayor incremento en el G-ratio observado en el primero.

En resumen, estos resultados sugieren que el tratamiento con cuprizona afecta negativamente al grosor de la vaina de mielina sin decremento en la velocidad de transmisión debido posiblemente al aumento del diámetro axonal. Por otro lado, el aumento en la velocidad de conducción del grupo Trasplantado con MSCs respecto a los valores normales de conducción indican la presencia de mecanismos regulatorios complejos e interdependientes sobre el control del grosor de la vaina de mielina y del diámetro axonal (ver discusión).

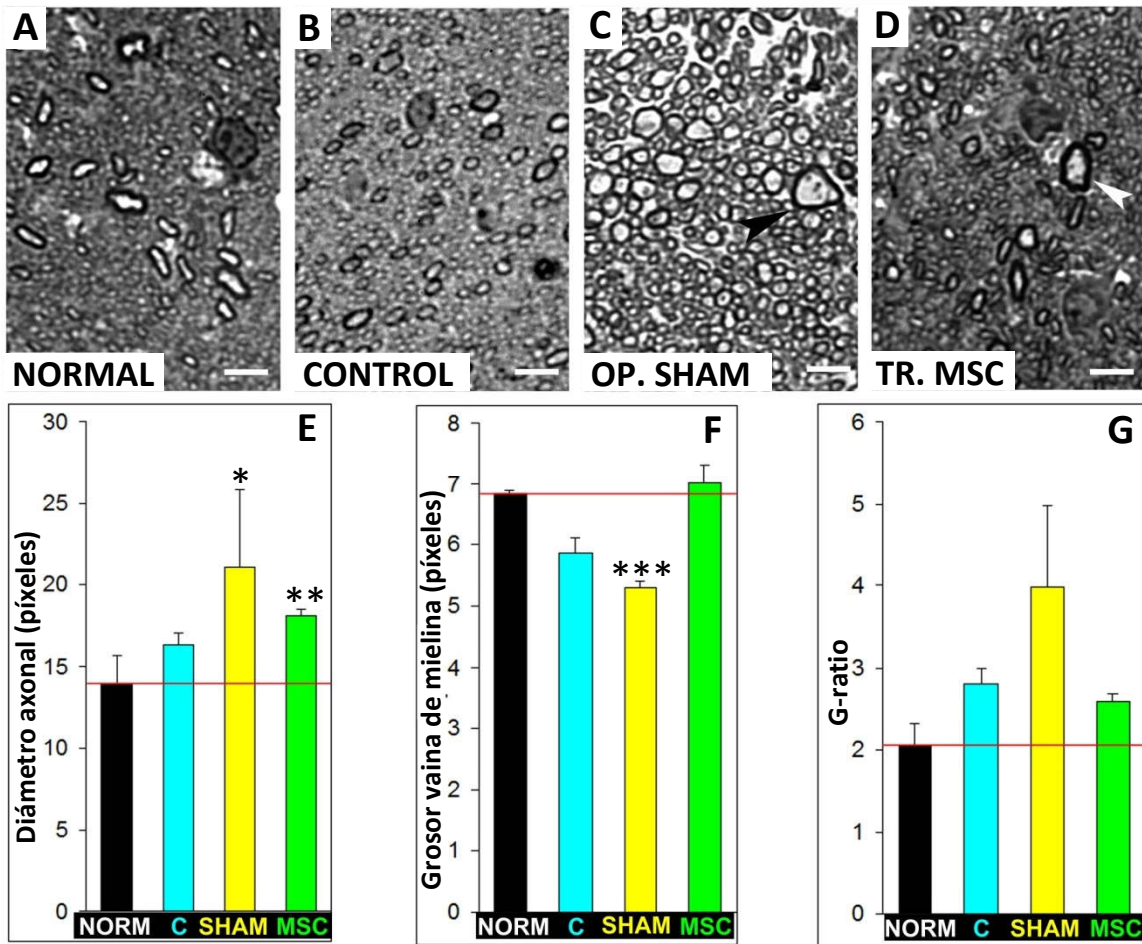
Figura R16 (página siguiente): Alteraciones estructurales axonales.

(A-D): Secciones de ultramicrotomo perpendiculares al eje longitudinal de la fimbria. Las zonas estudiadas corresponden a las regiones registradas mediante electrofisiología en los grupos Normal (A), Control (B), Operado Sham (C) y Trasplantado MSC (D). El grupo Control presenta una envoltura mielínica más fina y menos compacta que en condiciones normales. El grupo Operado Sham y Trasplantado MSCs se caracterizan por la existencia de axones de mayor diámetro que en condiciones normales (cabezas de flecha en C y D respectivamente). Sin embargo la vaina de mielina es más compacta y gruesa en el grupo Trasplantado con MSCs.

(E-G): Histograma del diámetro axonal (E), grosor de la vaina de mielina (F), y G-ratio (G) en el grupo Normal (barra negra), Control (barra azul), Operado Sham (barra amarilla) y Trasplantado con MSCs (barra verde). La línea roja señala el valor normal.

Escala: 5 μm en A-D. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.





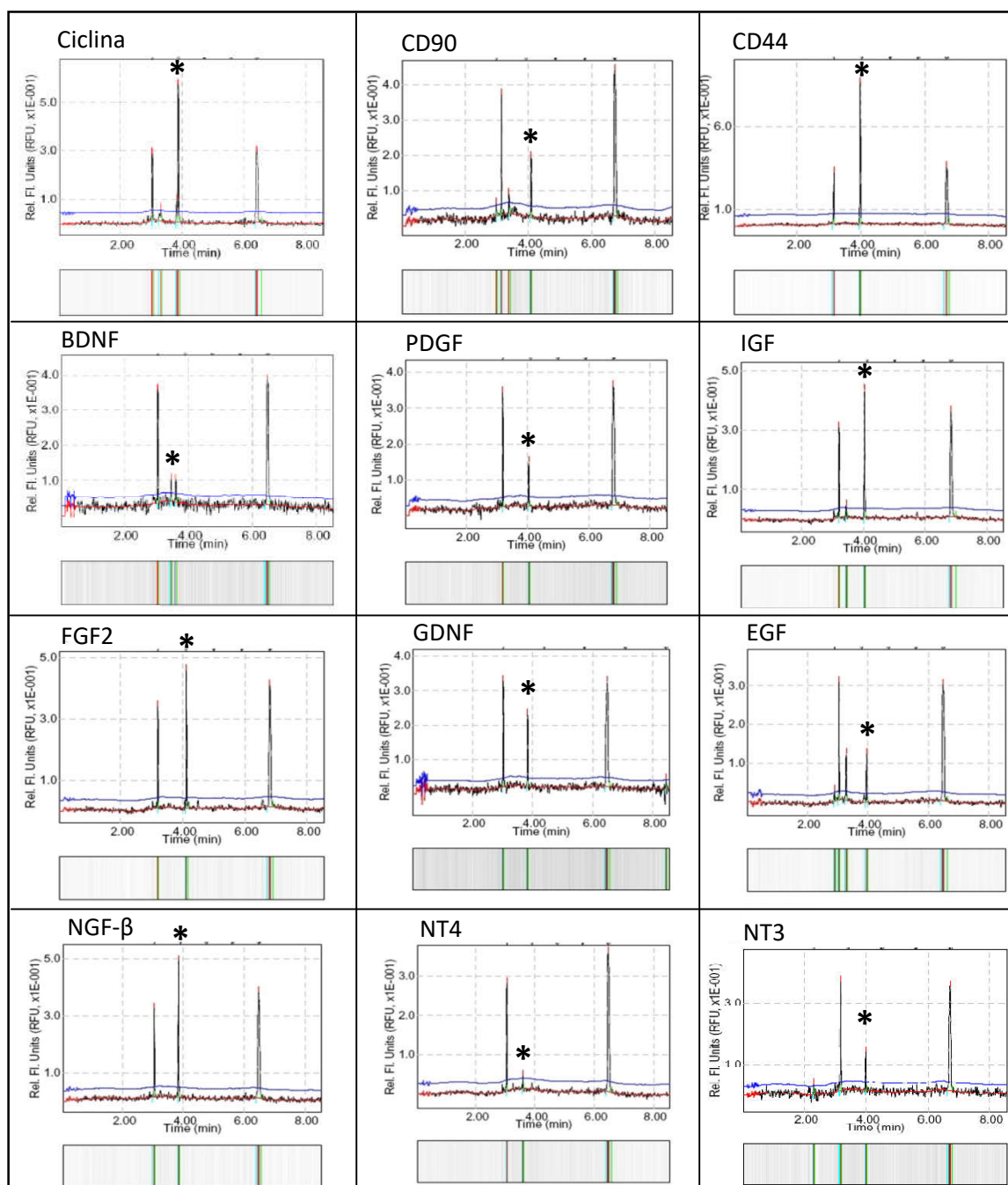
4.- EL TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES LIBERA FACTORES IMPLICADOS EN PROLIFERACIÓN, SUPERVIVENCIA Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS DE OLIGODENDROCITOS.

Para esclarecer los mecanismos por los que el trasplante de MSCs incrementa la atracción de CPOs, la formación de mielina y el aumento de la velocidad de transmisión, se identificó el secretoma de estas células en las condiciones previas y posteriormente al trasplante.

Se pretende de este modo determinar la capacidad de producción de factores solubles capaces de activar la proliferación, supervivencia y diferenciación de CPOs propios del huésped liberados por las MSCs en estas dos condiciones.

4.1.- SECRETOMA DE LAS MSCs EN CULTIVO.

Se identificó la presencia del transcrito del gen ubicuo β -actina como control general de las reacciones, mientras que los transcritos de las moléculas CD90 y CD44 se utilizaron como controles específicos al ser marcadores propios de las MSCs. La presencia del transcrito de ciclina en las células trasplantadas indica que las células continúan replicándose en cultivo en el momento previo al trasplante y que por tanto no están en estado senescente. Se identificó la presencia de transcritos de los siguientes factores tróficos que se sabe son capaces de inducir remielinización: PDGF, BDNF, IGF, FGF2, EGF, NGF- β , GDNF, NT3 y NT4/5 (Figura R17).



◀ **Figura R17** (página anterior): **Análisis transcripcional de las MSCs en Cultivo.**

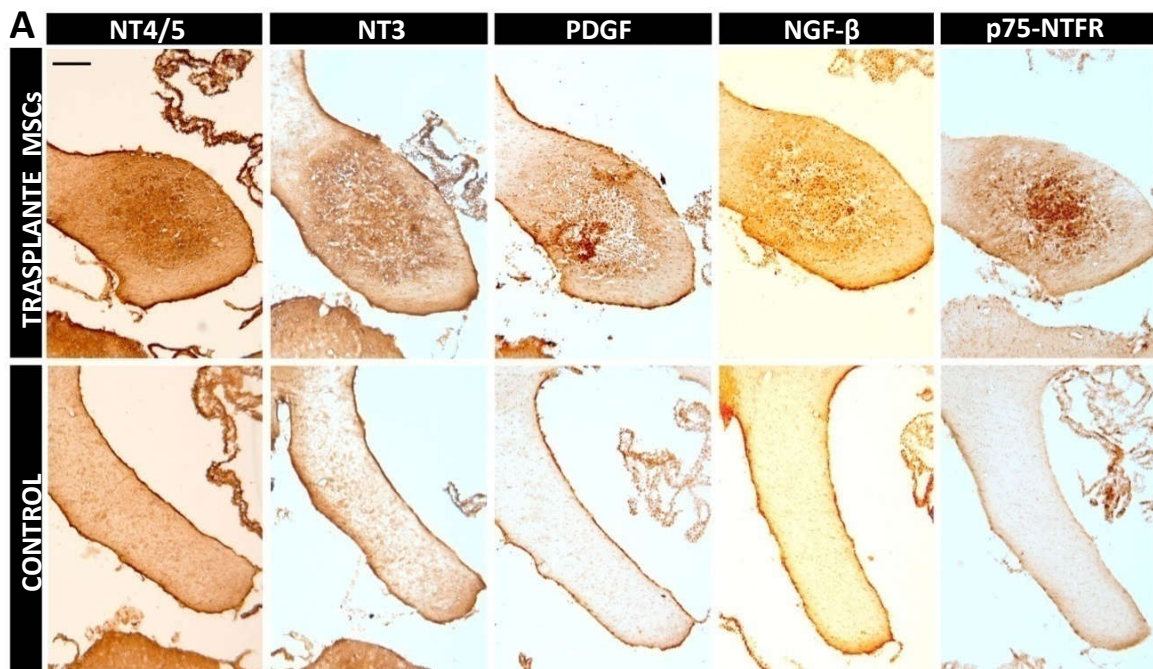
En los gráficos se muestra el resultado de amplificación de los transcritos mediante PCR. El resultado de la reacción fue analizado semicuantitativamente mediante el software de análisis de gel QIAxcel. En el eje vertical se muestra las unidades de fluorescencia detectada que es directamente proporcional a la cantidad de DNA amplificado. En el eje horizontal se representa el tiempo que tarda en aparecer el amplificado a estudiar, directamente proporcional a su tamaño molecular. En todas las reacciones se añaden dos patrones de pesos moleculares: el más pequeño de 15kb aparece a los 3.3 minutos, y el más grande de 1000kb a los 6.5 minutos. La línea azul señala el umbral para considerar un amplificado positivo descartando el ruido de fondo. Debajo de cada gráfica se adjunta la representación digitalizada de la separación de fragmentos, en el que los más pequeños se sitúan a la izquierda al ser los primeros en aparecer.

4.2.- SECRETOMA DE LAS MSCs TRASPLANTADAS.

Adicionalmente se estudió la producción de estos factores tróficos 90 días después de haber realizado el trasplante en la fimbria mediante inmunohistoquímica y PCR cuantitativa.

Se observó un incremento respecto al grupo Normal en la expresión de NT3 (2.20 ± 0.20 ua), NT4/5 (2.06 ± 0.30 ua), NGF- β (2.25 ± 0.20 ua) y PDGF (2.11 ± 0.40), así como el receptor de baja afinidad del factor de crecimiento nervioso NTFR-p75, pero no BDNF, GDNF y NTN (Figura R18A y B), comprobando de este modo que tras el trasplante hay ganancia de expresión de NT3, pero a su vez pérdida de IGF y BDNF (n=4).

En la fimbria Control (contralateral al trasplante, n=7), al igual que el grupo Operado Sham (n=3), la expresión de estos factores es igual al grupo normal (n=3).



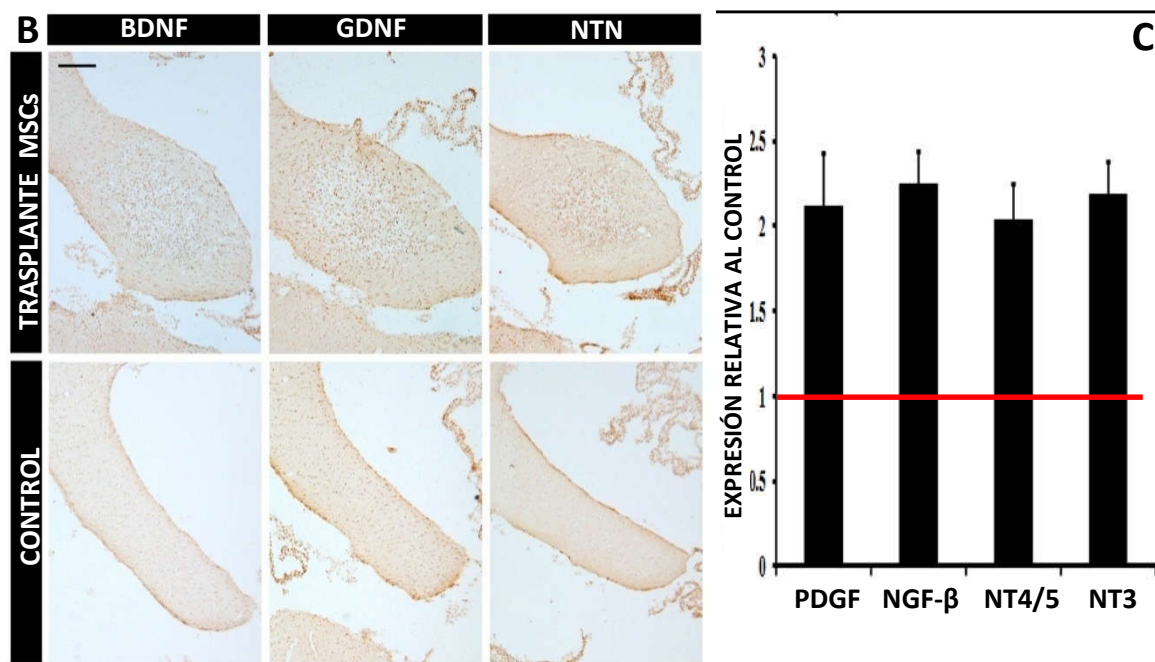


Figura R18 (junto a página anterior): **Análisis inmunohistoquímico de varios factores tróficos** en la fimbria trasplantada con MSCs en relación a la fimbria Control.

(A) Existe sobreexpresión de NT4/5, NT3, PDGF, NGF-β y p75-NTR.

(B) No se detectó expresión de BDNF, GDNF e IGF.

(C) Histograma que cuantifica la inmunorreactividad de los factores tróficos en (A) relativo al Control (línea roja).

Escala: 50 μm.

Además FGF2, factor de crecimiento implicado en proliferación, supervivencia, diferenciación y neuroprotección de células neurales embrionarias y adultas (Reuss et al., 2003), capaz de inducir remielinización en ratones tratados con cuprizona (Kumar et al., 2007), está sobre-expresado respecto al grupo Normal, un $229\% \pm 18$ en el grupo Trasplantado con MSCs ($n=5$), $127\% \pm 9$ en el grupo Control ($n=8$) y $130\% \pm 33$ en el grupo Operado Sham ($n=3$); (Figura R19A). Esto significa que el trasplante de MSCs incrementa la expresión de FGF2 en la fimbria trasplantada 1.75 veces ($t=3.06$; p valor=0.022).

Por otro lado IGF-1, otro factor trófico implicado en remielinización, aumentó su expresión respecto al grupo Normal, un $452\% \pm 50$ en el grupo Trasplantado con MSCs ($n=5$), $112\% \pm 6$ en el grupo Control ($n=8$), y $218\% \pm 68$ en el grupo Operado Sham ($n=3$); (Figura R19B). Por tanto, el trasplante de MSCs IGF-1 en la fimbria trasplantada 2 veces ($t=2.32$; p valor=0.04).

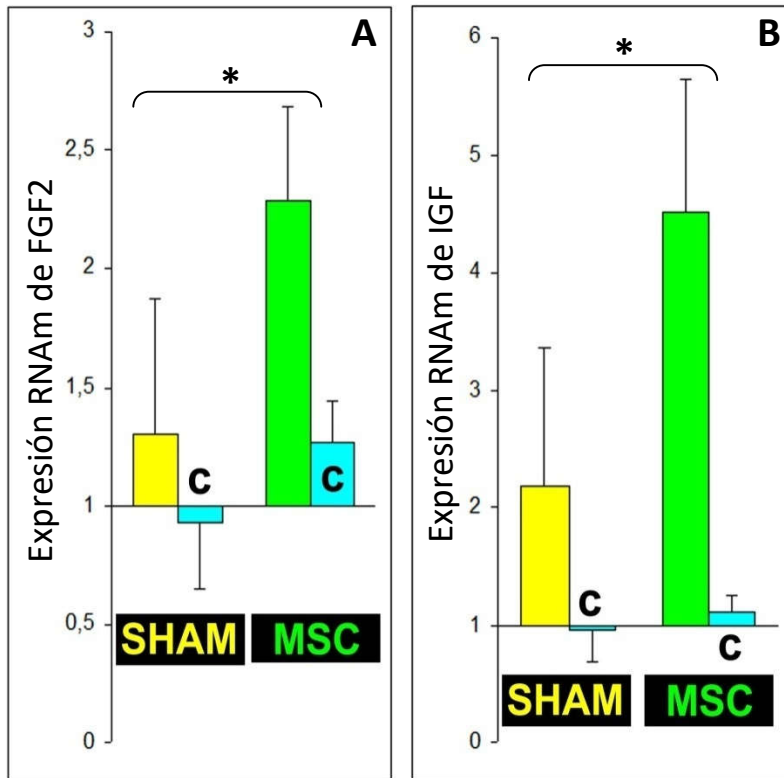


Figura R19: Análisis de expresión de FGF2 (A) e IGF (B) mediante PCR en tiempo real en las fimbrias del grupo Trasplantado con MSCs (barras verdes), Operado Sham (barras amarillas) y Control (barras azules).

Todos los grupos se han estandarizado al valor de una fimbria Normal (1) y al valor de expresión de β -actina como control endógeno. En el grupo Trasplantado con MSCs se observa un incremento en la expresión del gen del FGF2 ($t=3.06$; p valor=0.022) y del gen de IGF ($t=2.32$; p valor=0.04) al comparar con el grupo Operado Sham.

No se observan diferencias significativas comparando el grupo Operado Sham con el grupo Control. * $p < 0.05$.

5.- LAS CÉLULAS MESENQUIMALES ESTIMULAN LA DIFERENCIACIÓN Y MIGRACIÓN OLIGODENDROGLIAL DESDE LA ZONA SUBPENDIMARIA Y EL GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO.

Los resultados mostrados anteriormente muestran un reclutamiento de CPOs en la fimbria debido al efecto paracrino que ejercen varios de los factores tróficos liberados por las MSCs trasplantadas. Habiendo descartado su origen mediante la transdiferenciación de las MSCs, posiblemente las CPOs provienen de nichos neurogénicos la zona subependimaria y el giro dentado del hipocampo. Esta circunstancia se debe a que la superficie ventricular del cuerpo caloso, del septo caudal y la fimbria coinciden en el polo dorso-caudal del ventrículo lateral, el cual discurre sobre la superficie ventricular de la formación hipocampal.

En este apartado se prestó especial atención en la actividad de estos nichos neurogénicos del sistema nervioso central adulto 90 días después de haber realizado el trasplante de MSCs.

5.1.- ZONA SUBPENDIMARIA.

Se dividió la zona subependimaria en tres regiones: rostral (R), medial (M) y caudal (C). Esta zona de estudio comprende el origen rostral de los ventrículos laterales (inicio del nivel R), hasta

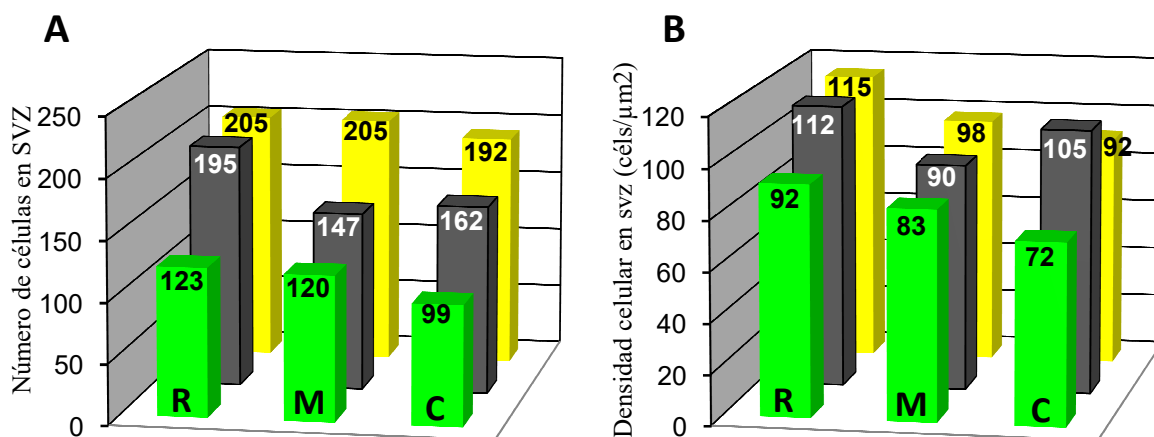
los niveles donde se localiza el trasplante en la fimbria (final del nivel C) (ver apartado 12.4 de material y métodos). Se cuantificó el número absoluto de células que residen en este nicho neurogénico, así como la densidad celular (Figura R20A y B).

En un ratón Normal (barra gris, n=6), el número de células es mayor en la región R de la zona subventricular (195 céls \pm 4.66) frente a la región M (147 céls \pm 0.25) y C (162 céls \pm 5.83), siendo no significativas las diferencias entre estas dos últimas. Sin embargo la densidad celular se mantiene constante en todos los cortes analizados (R=112 céls/ μm^2 \pm 3.52; M=90 céls/ μm^2 \pm 7.63; C=105 céls/ μm^2 \pm 6.20).

En el grupo Operado Sham (barra amarilla, n=4), el número de células en la zona R es similar al grupo Normal (205 céls \pm 10.34), pero en los niveles M y C hay un mayor número de células respecto al grupo Normal (205 céls \pm 19.39 y 192 céls \pm 3.81 respectivamente). Por el contrario, la densidad celular es menor en los tres niveles (R=115 céls/ μm^2 \pm 3.76; M=98 céls/ μm^2 \pm 4.39; C=92 céls/ μm^2 \pm 1.42).

En el caso del grupo Trasplantado con MSCs (barra verde, n=7) existe un decremento significativo del número de células en las tres zonas respecto al grupo Normal (p valor=0.015) y al grupo Operado Sham (p valor=0.03), siendo estas diferencias más acusadas en el nivel C más cercano al trasplante (R=123 céls \pm 8.89; M=120 céls \pm 13.33; C=99 céls \pm 12.24). Igualmente hay una disminución en la densidad celular en esta estructura siendo la zona más cercana al trasplante la más despoblada con abundantes espacios acelulares (R=92 céls/ μm^2 \pm 3.01; M=83 céls/ μm^2 \pm 15.91; C=72 céls/ μm^2 \pm 9.79).

La disminución de la población celular en la zona subventricular próxima al trasplante es compatible con una movilización de progenitores de esta área hacia el trasplante por el efecto quimiotáctico que presentan algunas de las moléculas secretadas por las MSCs trasplantadas. Además, este efecto no se observa en el grupo Operado Sham.



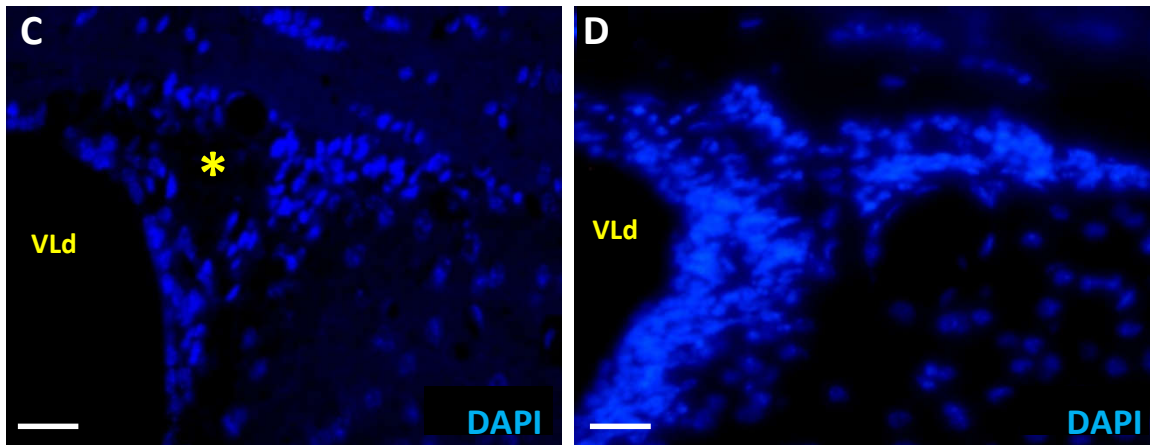


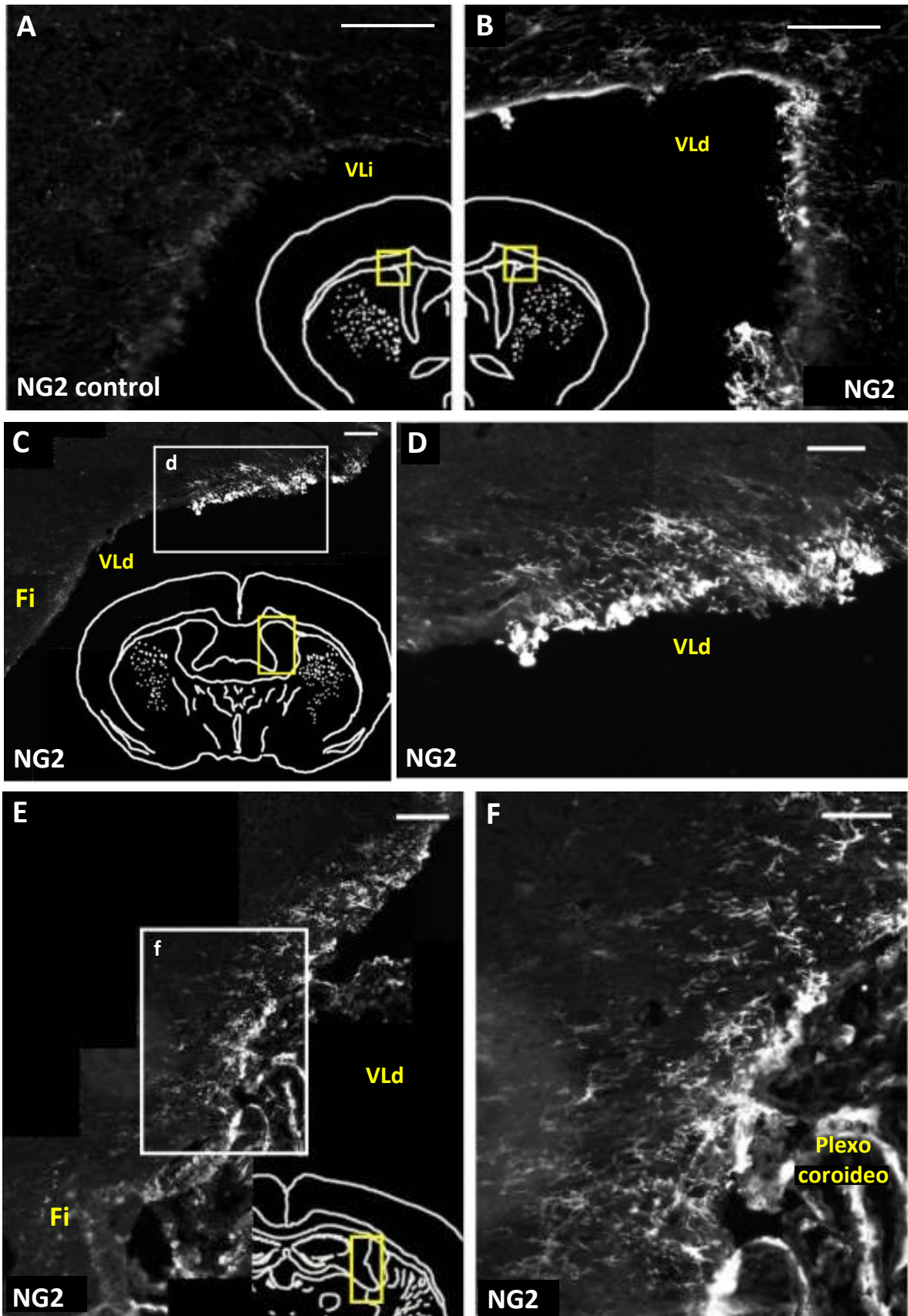
Figura R20 (junto a página anterior): Zona subventricular.

(A, B): Histograma mostrando el número absoluto de células (A) y la densidad celular (B) en las regiones rostral “R”, medial “M” y caudal “C” de la zona subventricular derecha en el grupo Trasplantado con MSCs (barra verde), Operado Sham (barra amarilla) y grupo Normal (barra negra). El ventrículo lateral izquierdo no presenta diferencias significativas respecto al derecho dentro de un mismo grupo. El grupo Trasplantado con MSCs presenta significativamente menos células comparado con el Operado Sham (p valor = 0.003) y con el grupo Normal (p valor = 0.015). En el grupo Operado Sham se evidencia un aumento sobre el valor normal en el número de células en secciones próximas al lugar de lesión (p valor = 0.049) sin embargo, no se acompaña de un incremento en la densidad celular, sugiriendo un aumento de volumen en la región analizada.

(C, D): Tinción nuclear de la región estudiada en el grupo Trasplantado con MSCs (C) y Operado Sham (D). El descenso en el número absoluto y de la densidad celular en el grupo trasplantado con MSCs se acompaña de abundantes espacios acelulares que no se observan en el resto de los grupos (asterisco amarillo en C).
VLd: ventrículo lateral derecho. Escala: 25 μ m.

Observando el subependimo del ventrículo lateral, se puede identificar histológicamente en todos los animales trasplantados, CPOs inmunorreactivas para NG2 que migran desde este nicho (zona subependimaria supero-lateral del nivel “R” del ventrículo lateral), hacia la fimbria trasplantada (periferia del trasplante en el nivel “C”) sin apenas invadir el alveus u otras estructuras corticales hipocámpales (Figura R21). Estas células presentan prolongaciones citoplasmáticas con una misma orientación que discurre rostro-medial a caudo-lateral sugiriendo una fuente común de atracción (Figura R21D) y no aparecen en la fimbria lateral (grupo Control) donde no se han trasplantado MSCs (Figura R21H).

Para confirmar que el origen de estas CPO se sitúa en la zona subependimaria, se ha analizado la expresión de Nilo1, un marcador específico de los precursores neurales de la zona subependimaria (Del Valle et al., 2010). Prácticamente el 100% de las CPOs que expresan NG2 también expresan Nilo1 confirmando que el origen de éstas células es este nicho neurogénico (Figura R22).



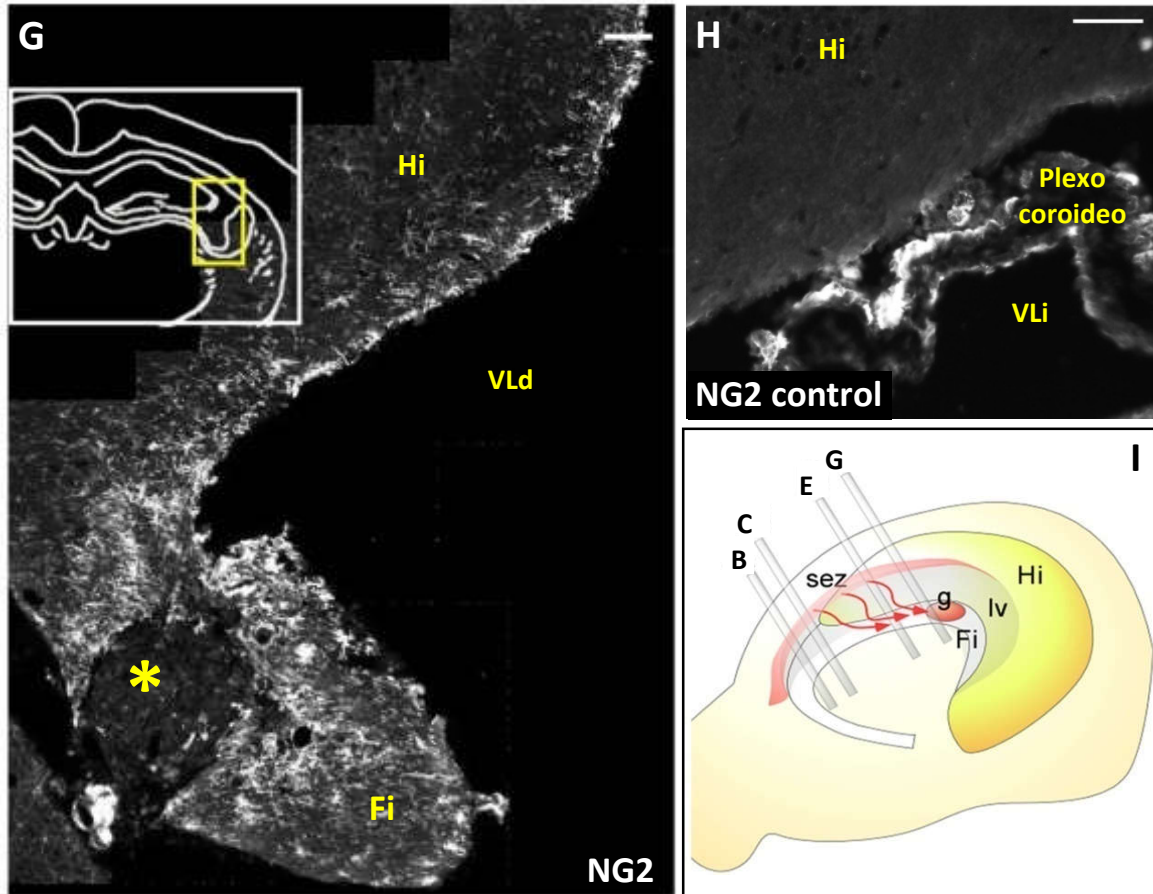


Figura R21 (junto a página anterior): **Migración de CPO hacia el trasplante.**

Secciones coronales del ventrículo izquierdo Control (**A, H**) y del derecho, Trasplantado con MSCs en la fimbria (**B-G**) mostrando CPOs inmunorreactivos para NG2 migrando rostro-caudalmente en el lado donde se ha realizado el trasplante de MSCs.

La activación de los CPOs ocurre en las regiones supero-laterales del ventrículo lateral, y discurre en dirección rostro-caudal bordeando el ventrículo lateral hasta alcanzar la fimbria (B, C, E y G son secciones consecutivas rostro-caudalmente). En (G) se observan CPOs NG2+ rodeando el trasplante de MSCs (estrella) y la extensa activación de la zona subependimaria hipocampal adyacente. Las zonas subependimarias no trasplantadas (control) no presentan predendrocitos activados (A y H).

(**D y F**): Imagen magnificada de los recuadros en (C) y (E) respectivamente. En ellos se observa la polaridad de las prolongaciones de los predendrocitos en dirección a la fimbria trasplantada.

(**I**): Representación esquemática del proceso descrito y la distribución espacial de las imágenes observadas en (B, C, E, G).

Fi: fimbria; Hi: hipocampo; lv: ventrículo lateral; sez: zona subependimaria; VLd: ventrículo lateral derecho; VLi: ventrículo lateral izquierdo. Escala: 50 μ m en D, H; 75 μ m en F; 100 μ m en A-C, E, G.

5.2.- GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO.

En cortes longitudinales de la capa subgranular del giro dentado del hipocampo se pone de manifiesto la estrecha relación que presenta este nicho neurogénico con el lugar de la fimbria donde se ha realizado el trasplante.

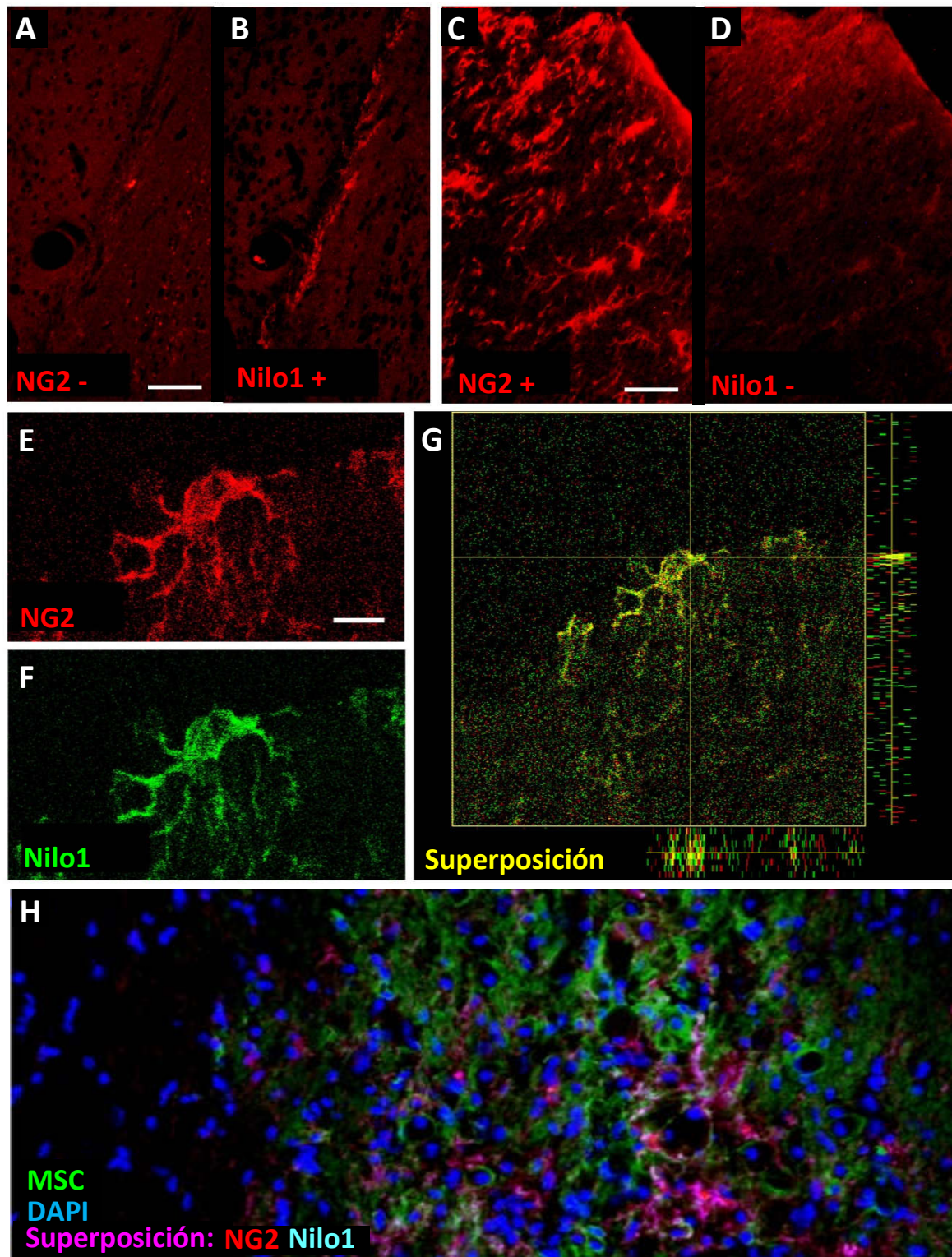
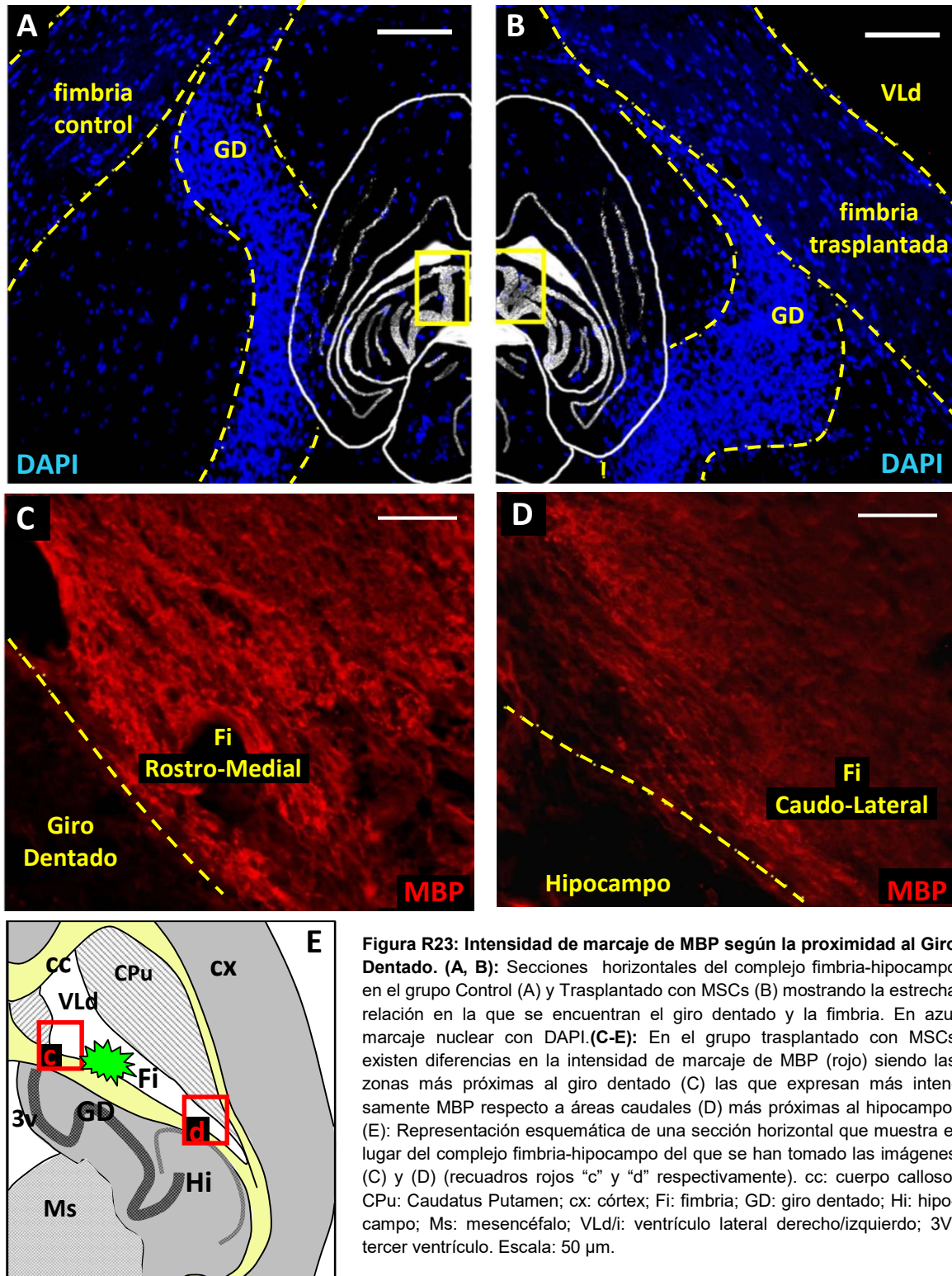


Figura R22: Origen de las CPOs. Análisis inmunohistoquímico de las CPOs NG2+/Nilo1+.

(A, B): Control positivo de Nilo1 en células NG2. Células Nilo1+ (B) en el camino migratorio rostral no expresan NG2 (A).
 (C, D): Control negativo de Nilo1 en células NG2. CPOs NG2+ en el fórnix que no expresan Nilo1.
 (E-G): Microscopía confocal de una célula NG2+/Nilo1+ de la zona subependimaria mostrando la colocalización de marcaje.
 (H) CPOs NG2 y Nilo1+ en la periferia del trasplante demostrando el origen subventricular de estas células.
 Escala: 50 μ m en A-D, H; 5 μ m en E, F.

Al igual que ocurre con la zona subependimaria, se observa un incremento en el número de células subgranulares del giro dentado del lado trasplantado respecto al lado contralateral (Figura R23A y B). Además, la zona proximal de la fimbria más cercana al giro dentado, presenta una mayor intensidad de expresión de MBP respecto a zonas más distales (Figura R23C y D). Por otro lado, las células NG2 del giro dentado del hipocampo expresan con mayor intensidad esta glicoproteína cuanto más próximo se encuentran al trasplante de MSCs (Figura R24 A-E).



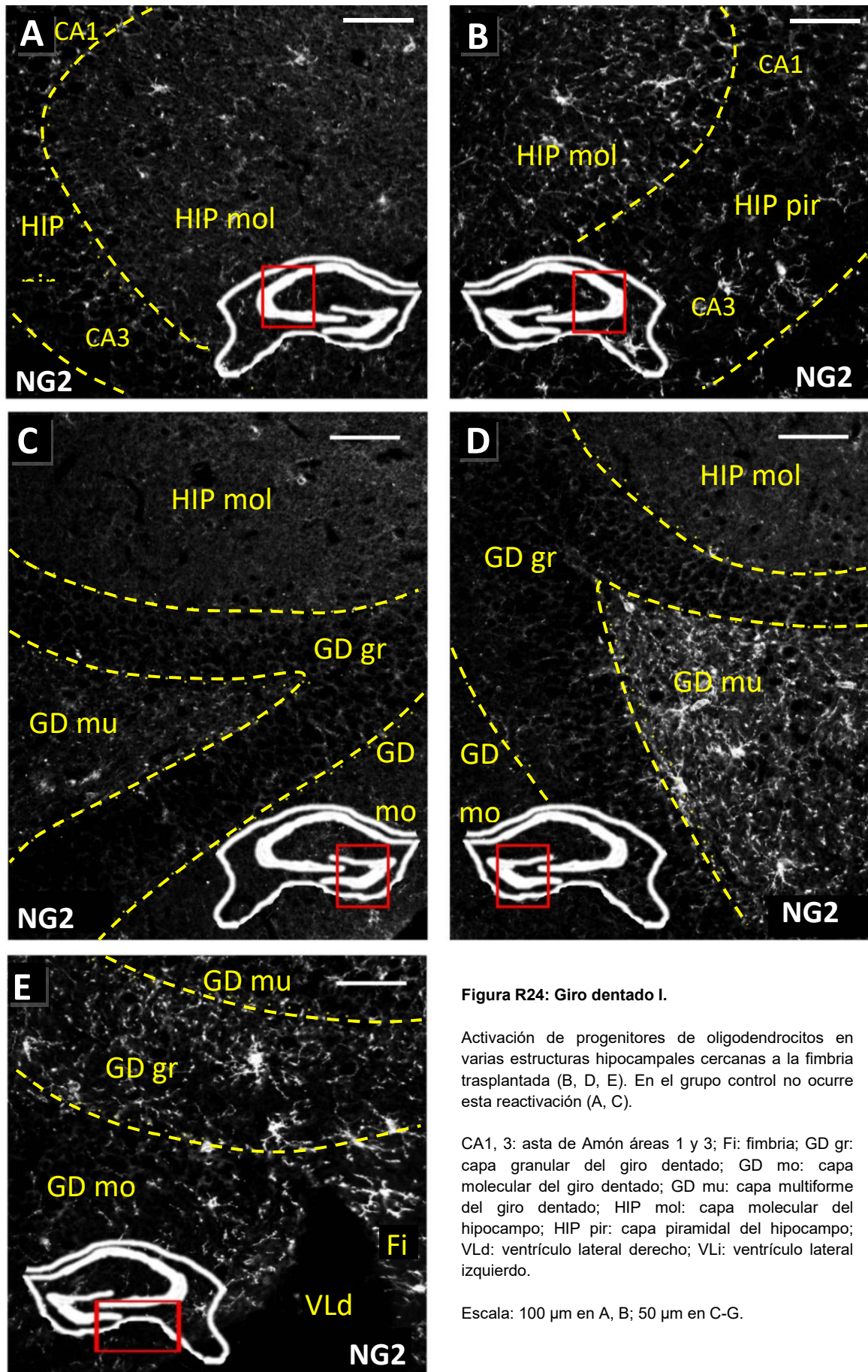


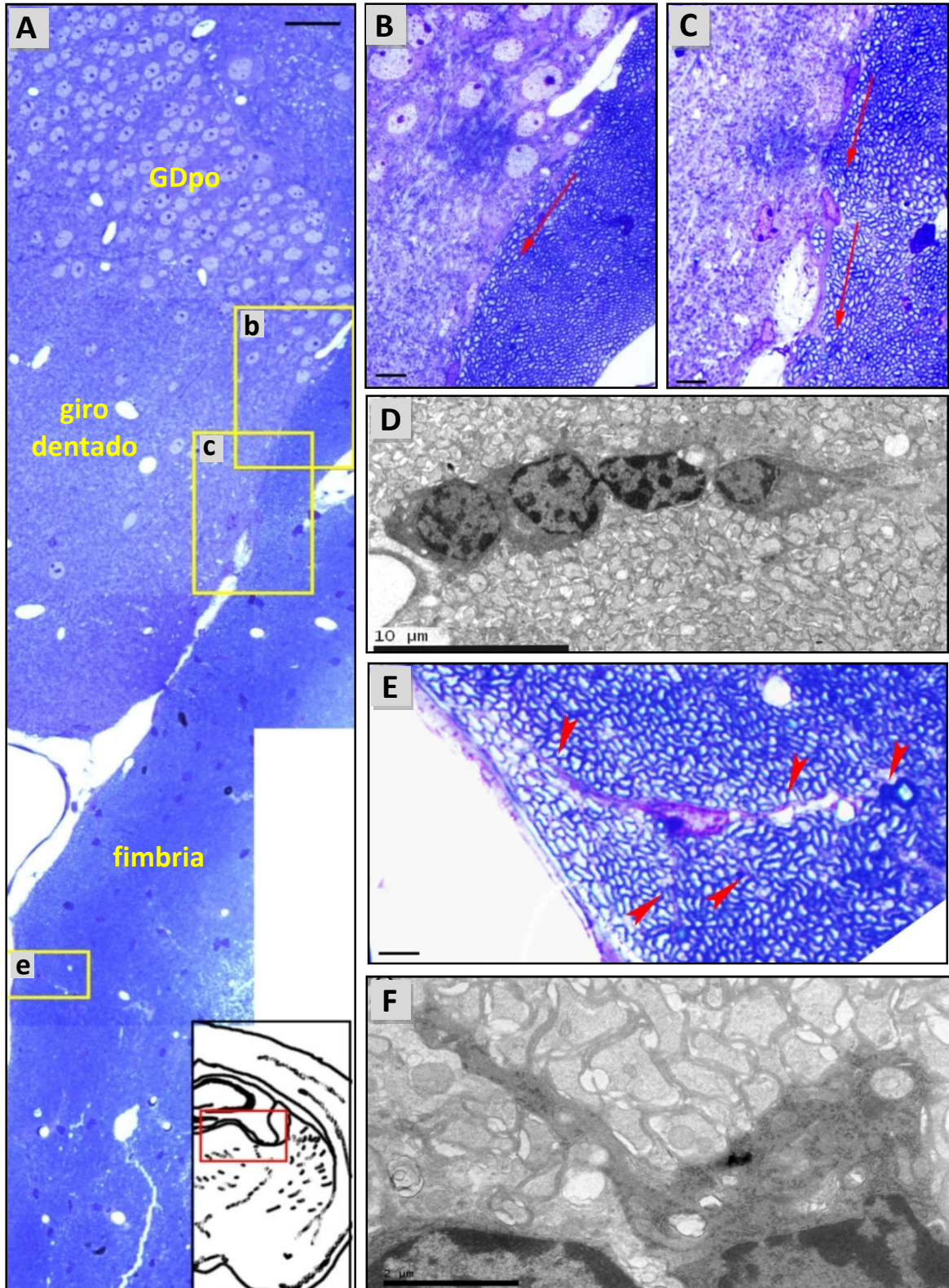
Figura R24: Giro dentado I.

Activación de progenitores de oligodendrocitos en varias estructuras hipocampales cercanas a la fimbria trasplantada (B, D, E). En el grupo control no ocurre esta reactivación (A, C).

CA1, 3: asta de Amón áreas 1 y 3; Fi: fimbria; GD gr: capa granular del giro dentado; GD mo: capa molecular del giro dentado; GD mu: capa multiforme del giro dentado; HIP mol: capa molecular del hipocampo; HIP pir: capa piramidal del hipocampo; VLd: ventrículo lateral derecho; VLi: ventrículo lateral izquierdo.

Escala: 100 μ m en A, B; 50 μ m en C-G.

Mediante microscopía electrónica se pueden identificar células que migran desde el polo distal subgranular a través de la región subependimaria de la fimbria (Figura R25 A-D) donde colonizan el parénquima de fibras nerviosas de la fimbria. Además, estas CPOs extienden prolongaciones que envuelven axones de forma similar a los procesos que emiten los oligodendrocitos mielinizantes (Figura R25 E-F). Estas células de la zona subgranular no expresan Nilo1.



◀ **Figura R25** (página anterior): **Giro dentado II.**

(A): Imagen reconstruida de secciones semifinas sagitales del complejo fimbria-hipocampo mostrando células migrando desde el giro dentado a la fimbria.

(B-C): Imágenes ampliadas de los recuadros “b” y “c” en (A). Las flechas rojas muestran la polaridad celular de acuerdo a la migración celular desde el giro dentado.

(D) Microscopía electrónica en la que se muestran CPOs en migración hacia el trasplante.

(E): Imagen ampliada del recuadro “h” en (A). Las cabezas de flecha muestran los procesos citoplásmicos de una CPO NG2+ envolviendo varios axones.

(F): Microscopía electrónica de los procesos citoplásmicos de una CPO.

GDpo: capa polimórfica del giro dentado. Escala: 50 μm en A; 10 μm en B- D; 5 μm en E; 2.5 μm en F.

6.- EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS 8, ATRAE CÉLULAS PROGENITORAS DE OLIGODENDROCITOS E INDUCE REMIELINIZACIÓN *in vivo*.

En estudios previos del laboratorio se ha demostrado que el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF8) interviene en la proliferación y migración radial de progenitores celulares durante el desarrollo embrionario (ver Discusión). Además pertenece a la misma familia que FGF2, directamente implicado en la maduración de CPOs y producción de mielina (Furusho et al., 2012). Por estos motivos se quiso averiguar si FGF8 también interviene y de qué forma lo hace, en el proceso de remielinización que promueven las MSCs.

6.1.- ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE FGF8 EN LAS MSCs.

Se realizaron tinciones inmunohistoquímicas de las MSCs en cultivo previo a la realización del trasplante y se observó que éstas células producían y acumulaban FGF8 en el citoplasma (Figura R26A). 90 días después de ser trasplantadas en la fimbria, las MSCs mantienen cierta cantidad de FGF8 en el interior de su citoplasma (Figura R26B y C), sin embargo también existe un gradiente de difusión extracelular de este factor trófico en la periferia del trasplante que se distribuye por la fimbria trasplantada. Estos datos sugieren que el FGF8 es liberado de las MSCs al tejido extracelular adyacente. No se detecta inmunohistoquímicamente FGF8 en la fimbria control (Figura R26D).

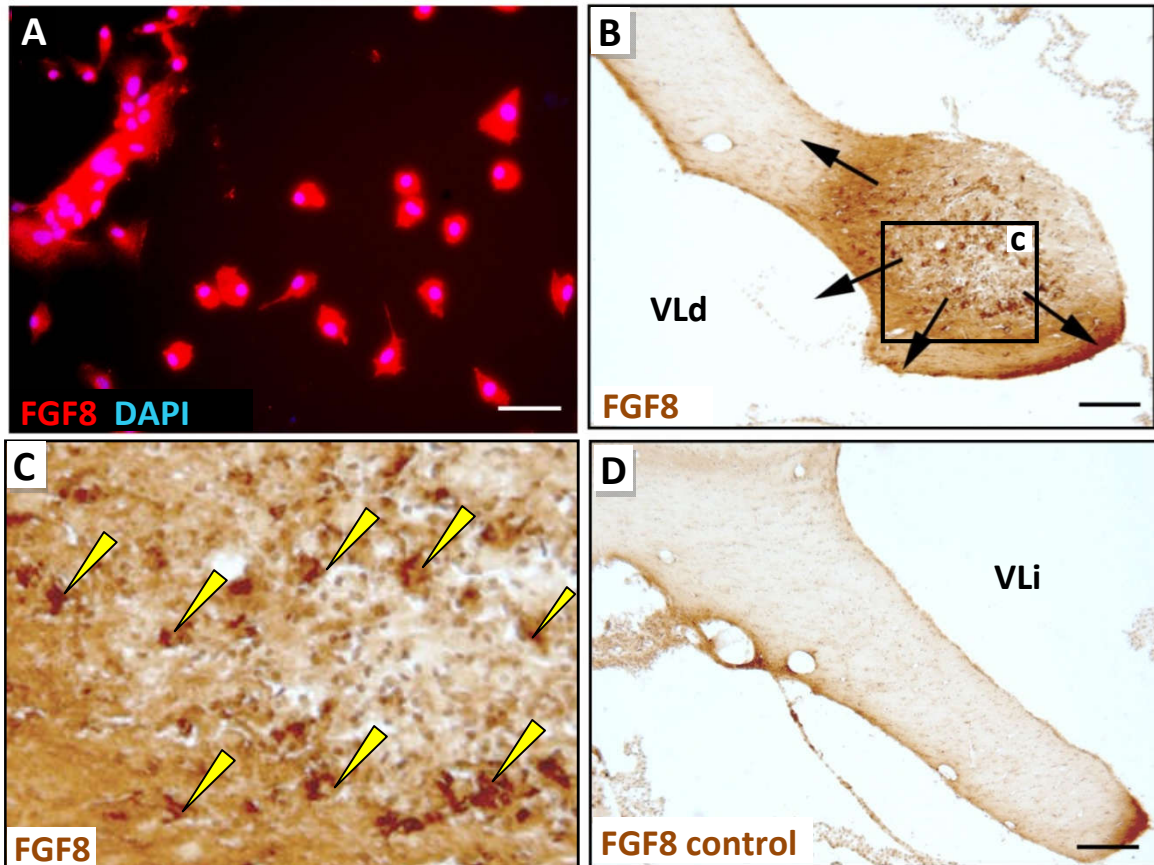
Figura R26 (página siguiente): **Expresión de FGF8 en las células madre mesenquimales.**

(A, B): Inmunomarcaje de las MSCs en cultivo (A) y después (B) del trasplante en la que se observa FGF8 acumulado en el citoplasma. En (B), la expresión de FGF8 presenta un gradiente desde el trasplante hasta el tejido periférico (flechas).

(C): Detalle del lugar trasplantado (recuadro en B) en la que se señalan MSCs inmunorreactivas para FGF8 (puntas de flecha).

(D): La fimbria trasplantada no sintetiza FGF8.

VLd/i: Ventrículo lateral derecho/izquierdo. Escala: 50 μm .



Pese a que las MSCs han sintetizado y almacenado FGF8 en su citoplasma, la transcripción génica de este factor trófico se encuentra reprimido en el momento previo al trasplante ya que no se detecta amplificación de mRNA de FGF8 en éstas células (Figura R27A). Sin embargo, es lógico pensar que hubo transcripción y traducción de este factor trófico en algún momento previo al cultivo celular, posiblemente previamente a la extracción de las células en su nicho celular de origen en la médula ósea.

Esta represión puede ser consecuencia de la existencia de sprouty 2 (SPY2), una proteína implicada en la ruta de regulación de FGF8 que inhibe la transcripción de este factor trófico. El mRNA de esta proteína reguladora se encuentra presente en las células en cultivo (Figura R27B).

Tras 90 días de haber realizado el trasplante de MSCs o equivalente en el resto de los grupos, se purificó el mRNA de la fimbria y se analizó mediante PCR en tiempo real.

De modo similar a lo que ocurre en cultivo de MSCs, la expresión de mRNA de FGF8 en las células trasplantadas se encuentra inhibida significativamente un $-62\% \pm 3$ respecto al grupo Normal ($t=-4.40$; p valor=0.012), mientras que en las fimbrias del grupo Control (fimbria

contralateral al trasplante) se incrementa de modo significativo un $112\% \pm 18$ frente al grupo Normal aunque, igual a lo que ocurre en cultivo, no hay síntesis de proteína FGF8 detectada inmunohistoquímicamente. Por otro lado, el grupo Operado Sham no presenta diferencias significativas en la expresión de FGF8 respecto al ratón Normal ($4.8\% \pm 2.7$) sugiriendo que este proceso es independiente a la lesión provocada por el proceso quirúrgico (Figura R27C).

Paralelamente a estos resultados, se estimó que la expresión de SPY2 se encuentra incrementada un $64\% \pm 5$ en el grupo trasplantado con MSCs ($t=4.57$; p valor=0.010), mientras que en el grupo Control, (donde sí se detecta mRNA de FGF8), apenas varía la expresión de SPY2 respecto al grupo normal ($9\% \pm 6$). Algo parecido ocurre en el grupo Operado Sham ($19\% \pm 11$), sugiriendo que las MSCs son las células responsables de la expresión de SPY2 en la fimbria (Figura R27D).

Al analizar la relación existente entre la expresión de SPY2 y FGF8 en cada individuo de los diferentes grupos estudiados, se encontró una cierta correlación inversa entre ambos con $r^2=0.77$, de modo que en las muestras con mayor expresión de SPY2 hay menos expresión de FGF8 y viceversa (Figura R27E).

6.2.- CAPACIDAD DE RESPUESTA DE LAS CPO FRENTE A LA SEÑALIZACIÓN POR FGF8.

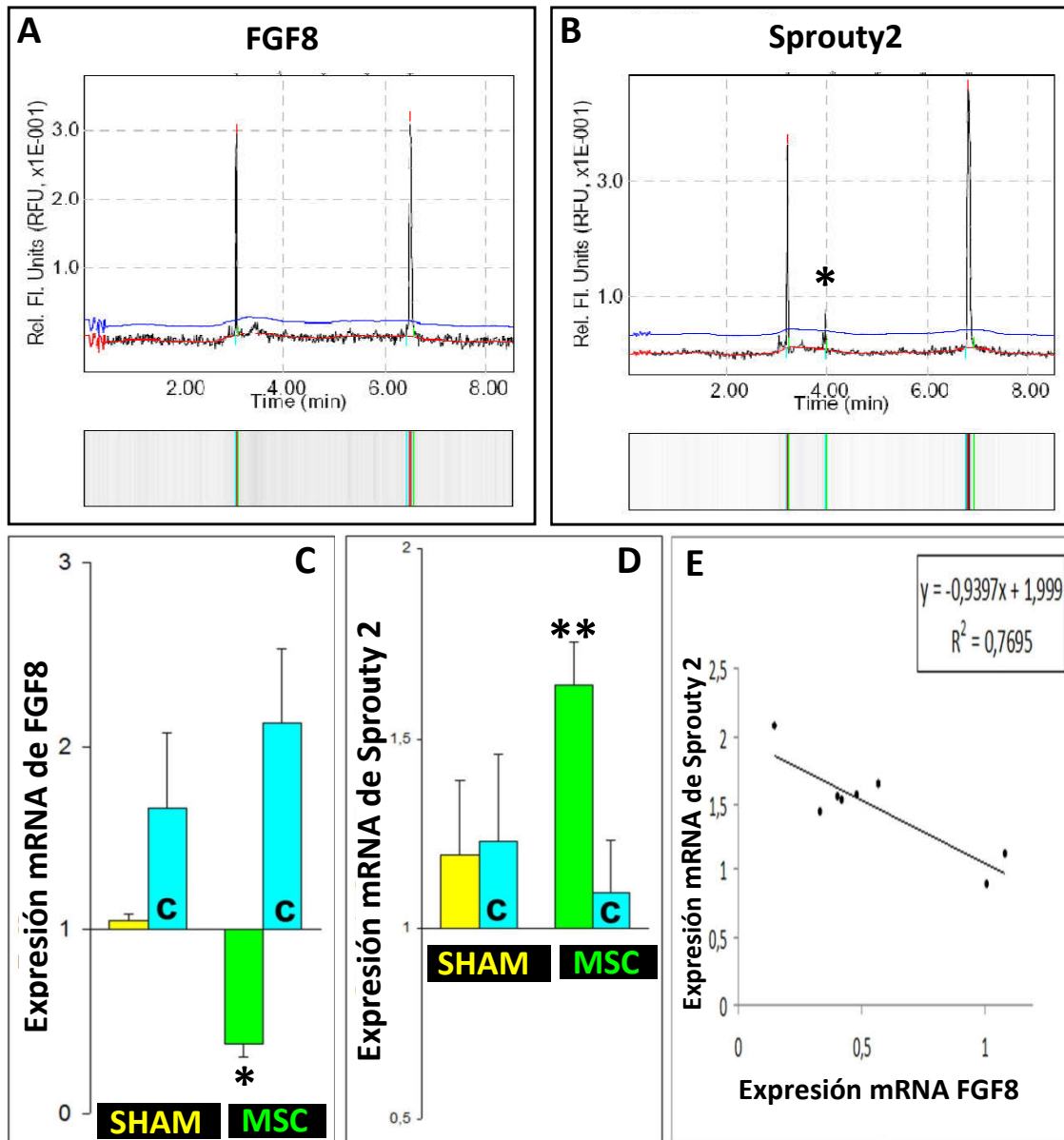
Si el FGF8 liberado por las MSCs trasplantadas ejerce un efecto a distancia sobre las CPO del husped, éstas han de tener las rutas de señalización intracelular dependientes de la unión de FGF8 a su receptor activas. Efectivamente, las CPOs que migran desde los nichos neurogénicos y las que rodean al trasplante expresan el producto de señalización intracelular de FGF8 fosfo-ERK (Figura R28) sugiriendo que estas células tienen activa la cascada de señalización cuyo origen es la unión de FGF8 a sus receptores de membrana. Esto significa que las CPO responden a la presencia de éste factor trófico a distancia.

Figura R27 (página siguiente): Cuantificación de la producción de FGF8.

(A, B): análisis semicuantitativo de la expresión de mRNA de FGF8 analizado mediante PCR de FGF8 (A) y sprouty2 (B) en células en cultivo en el momento previo del trasplante. Se observa que las MSCs son trasplantadas con la expresión de FGF8 ya inhibida. Se considera que ha habido amplificación cuando las unidades de fluorescencia que emite el amplificado supera la línea azul (asterisco). Flanqueando al amplificado, aparecen los patrones de pesos moleculares.

(C, D): análisis cuantitativo mediante PCR a tiempo real de la expresión de FGF8 (C) y sprouty2 (D) en un extracto de fimbria a los tres meses después del trasplante de MSCs (barra verde), Operado Sham (barra amarilla) o grupo Control (barra azul). Los valores se han relativizado al grupo Normal y a la expresión de β -actina como control endógeno. Se observa un descenso significativo de la expresión de FGF8 en el grupo trasplantado con MSCs respecto al grupo Normal ($t=-4.40$; p valor=0.012), mientras que la expresión de sprouty2 está incrementada significativamente ($t=4.57$; p valor=0.010). No se observan diferencias significativas comparando tanto la expresión de FGF8 como de sprouty2 en el grupo Operado Sham con el grupo Control.

(E): Análisis de regresión lineal que muestra la relación inversa entre la expresión de FGF8 y sprouty2 en los grupos trasplantado con MSCs, Operado Sham y Control. Una mayor expresión de sprouty2 se correlaciona con una expresión de FGF8 menor ($r^2=0.77$). * $p<0.05$; ** $p<0.01$.



6.3.- IMPLICACIÓN DE FGF8 EN LA REMIELINIZACIÓN.

Para esclarecer la implicación del FGF8 en el proceso de remielinización, se realizaron implantes de bolas de heparina embebidas con proteína recombinante FGF8 (grupo bFGF8) en la fimbria de un grupo de ratones desmielinizados crónicamente con cuprizona, mientras que en el grupo Operado Sham se implantaron bolas de heparina embebidas con PBS (grupo bPBS).

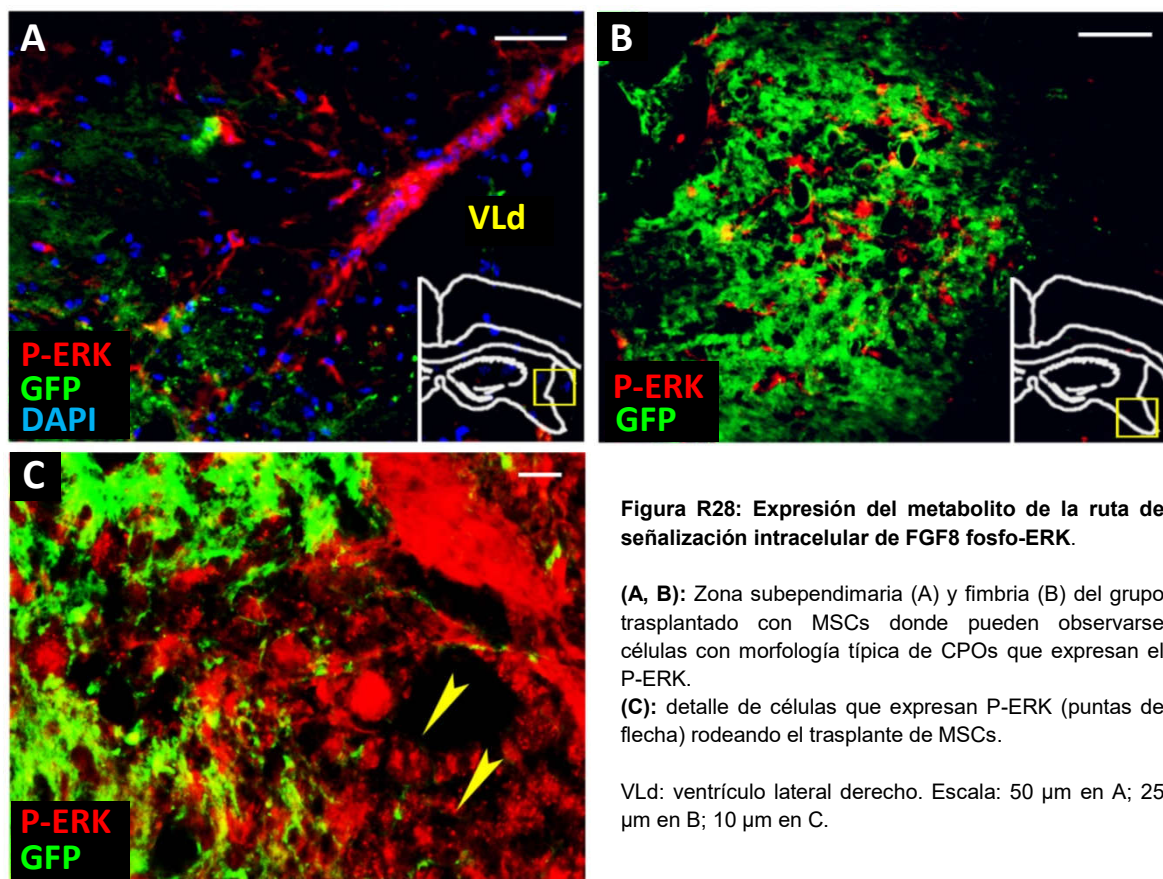


Figura R28: Expresión del metabolito de la ruta de señalización intracelular de FGF8 fosfo-ERK.

(A, B): Zona subependimaria (A) y fimbria (B) del grupo trasplantado con MSCs donde pueden observarse células con morfología típica de CPOs que expresan el P-ERK.

(C): detalle de células que expresan P-ERK (puntas de flecha) rodeando el trasplante de MSCs.

VLd: ventrículo lateral derecho. Escala: 50 μ m en A; 25 μ m en B; 10 μ m en C.

6.3.1.- ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE CPOs.

Curiosamente, de modo similar a lo que ocurre con el trasplante de MSCs, 90 días después de la cirugía aparecen CPOs rodeando las bolas embebidas con FGF8, e incluso toman contacto con ellas (Figura R29A). Sin embargo en el grupo bPBS no se observa este efecto (Figura R29B).

En el córtex y el cuerpo caloso del lado donde se implantaron las bolas también hay una mayor reactivación de CPOs debido, posiblemente, a la liberación de FGF8 en el trayecto de la aguja de inyección (Figura R29 C-E).

La presencia de CPOs en la periferia del trasplante en el grupo bFGF8 es once veces superior ($t=9.82$; p valor=0.0002) frente al grupo bPBS, sin embargo estos valores tienden a ser 1.7 veces inferior a los observados en el grupo trasplantado con MSCs presentado en el resultado 2.2, aunque estas diferencias no son significativas ($t=-1.31$; p valor=0.23) (Figura R29F): Implante bFGF8 $3.06\% \pm 0.15$ ($n=4$); Implante bPBS $0.28\% \pm 0.10$ ($n=4$); trasplante MSCs $5.23\% \pm 1.12$ ($n=10$); Operado Sham 0.72 ± 0.17 ($n=4$).

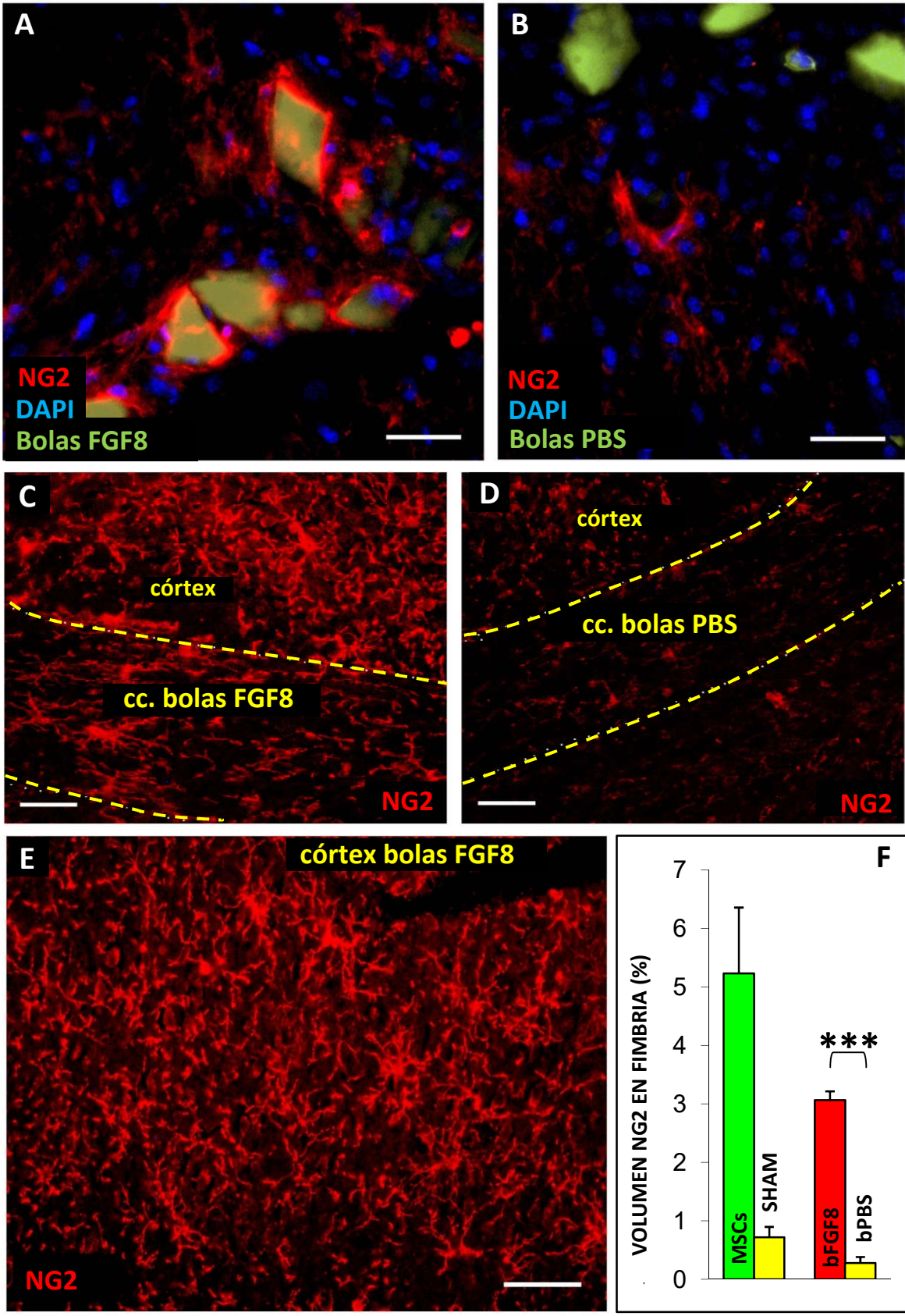


Figura R29 (página anterior): **Atracción de CPOs inducida por FGF8.**

(A, B) Bolas de heparina (en verde) y expresión de NG2 (en rojo) en (A): fimbria tratada con bolas embebidas con FGF8 (bFGF8); y (B) embebidas con PBS (bPBS).

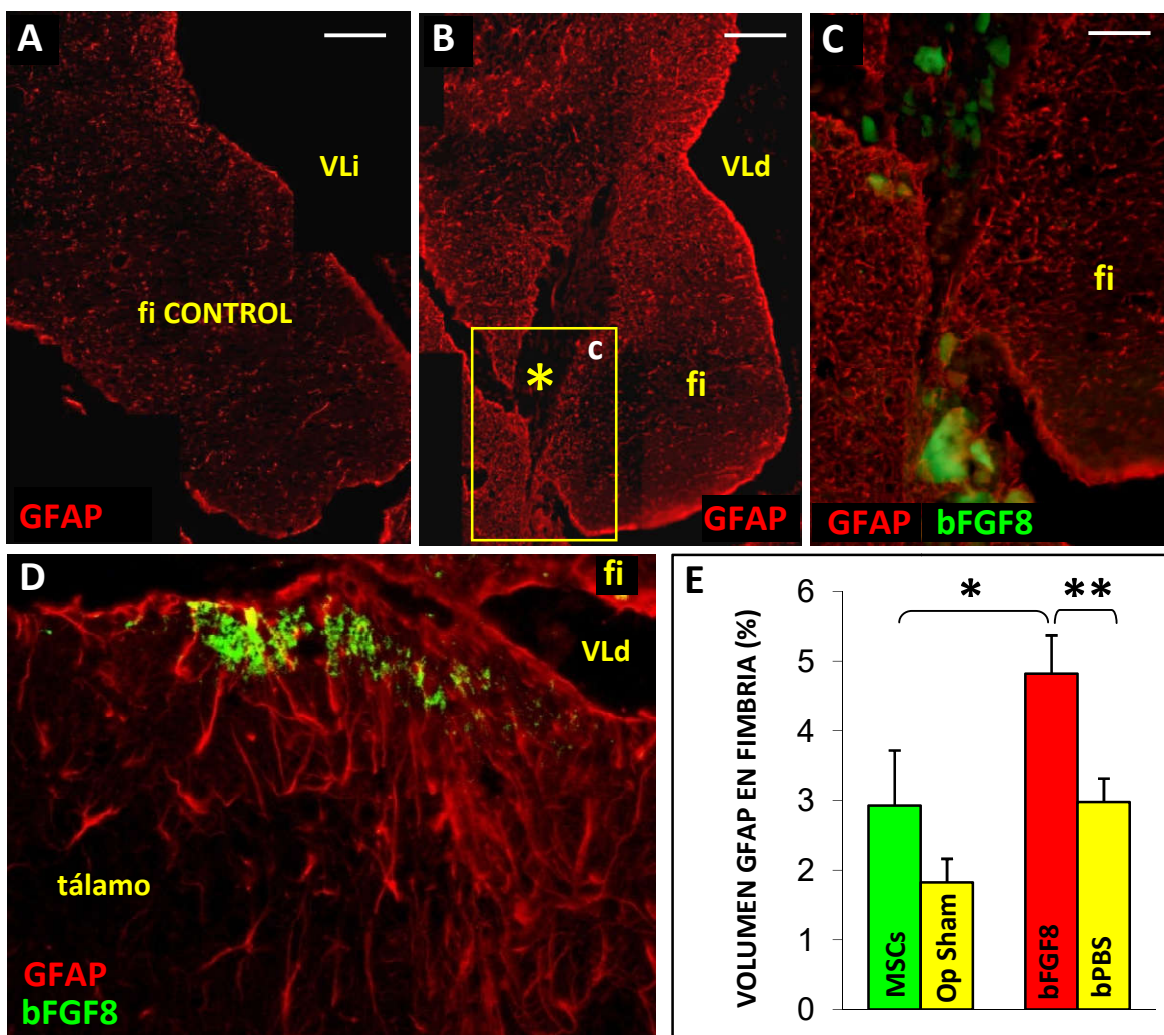
(C-E) Expresión de NG2 en el cuerpo caloso del grupo bFGF8 (C) y del grupo bPBS (D). En el grupo grupo bFGF8 también se incrementa la expresión de NG2 en la corteza cerebral (E).

(F): Cuantificación de la expresión de NG2 en el grupo trasplantado con MSCs (barra verde), grupo Operado Sham (barra amarilla), grupo bFGF8 (barra roja) y grupo bPBS (barra amarilla). Existen diferencias significativas entre el grupo bFGF8 respecto al grupo bPBS ($t=9.82$; p valor=0.0002). No existen diferencias significativas respecto al grupo trasplantando MSCs ($t=-1.31$; p valor=0.23).

cc: cuerpo caloso. Escala: 50 μ m. *** p <0.001.

6.3.2.- ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE LA REACCIÓN ASTROGLIAL.

Por otro lado, el grupo bFGF8 tiende a producir una reacción glial 1.6 veces mayor que el grupo bPBS ($t=4.88$; p valor=0.005). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría con el resultado anterior, al compararlo respecto al trasplante de MSCs se observa un incremento de la reacción astrogliar ($t=1.56$; p valor=0.04). (Figura R30E): Implante bFGF8 $4.82\% \pm 0.55$ ($n=4$); Implante bPBS $2.98\% \pm 0.34$ ($n=4$); grupo trasplantado con MSCs 2.93 ± 0.79 ($n=10$); grupo Operado Sham 1.82 ± 0.34 ($n=4$).



◀ **Figura R30** (página anterior): **Reacción astrogliar inducida por FGF8.**

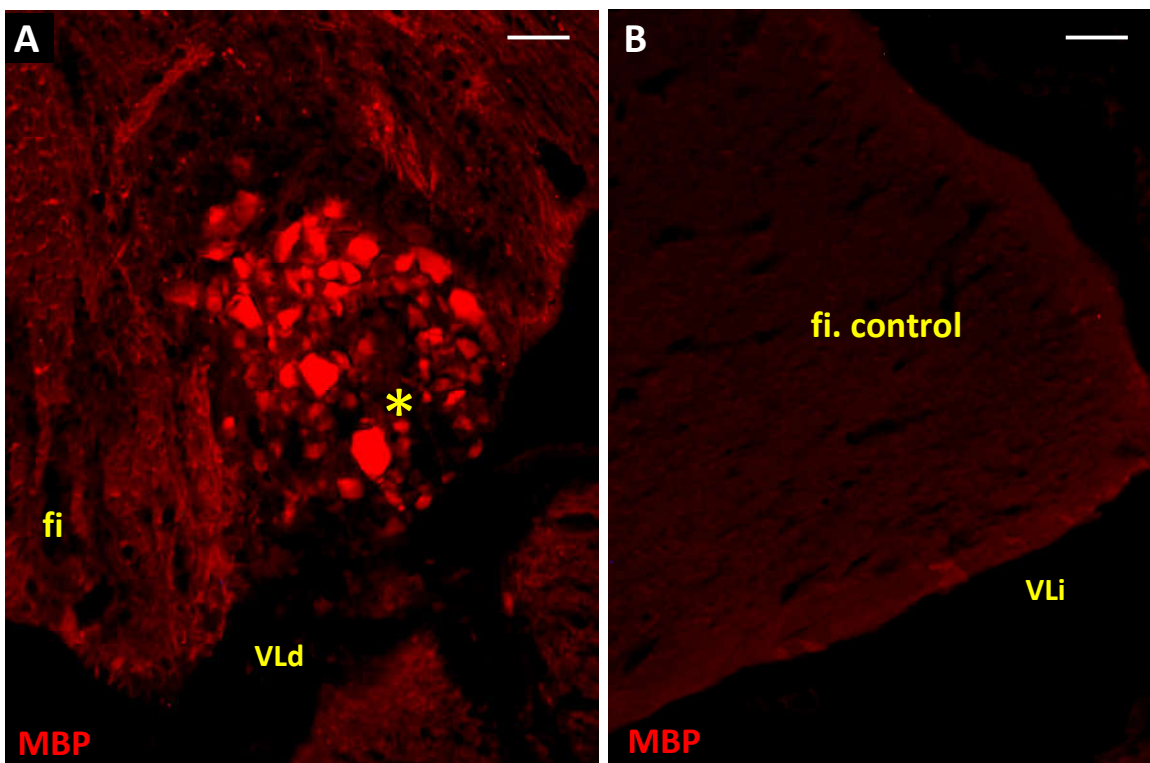
(A-D): Imagen reconstruida de la fimbria control (A) y del grupo bFGF8 (B) donde se observa una mayor reacción glial (rojo) en la periferia del implante (estrella amarilla). (C): Detalle del recuadro en (B) incluyendo las bolas (verde). (D): Detalle de núcleos talámicos ventrales a la fimbria en contacto con restos de un implante (verde) mostrando que la reacción glial observada no solamente se produce en la fimbria.

(E): Cuantificación de la expresión de GFAP en el grupo trasplantado con MSCs (barra verde), Operado Sham (barra amarilla), implantado con bolas embebidas con FGF8 (bFGF8: barra roja) e implantado con bolas embebidas en PBS (bPBS: barra amarilla). Se observa un incremento significativo entre el grupo bFGF8 respecto al grupo bPBS ($t=4.88$; p valor=0.005) y respecto a los obtenidos trasplantando MSCs ($t=1.56$; p valor=0.04).

VLd/i: Ventrículo lateral derecho/izquierdo; fi: fimbria. Escala: 100 μ m en A, B; 50 μ m en C; 25 μ m en D. * p <0.05, ** p <0.01.

6.3.3.- ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MIELINA.

En el grupo bFGF8 se incrementa 2.7 veces la producción de mielina en la periferia del implante al comparar con el grupo bPBS ($t=11.75$; p valor=0.0003). Además, estos resultados son similares a los obtenidos el grupo trasplantado con MSCs sin evidenciar diferencia estadísticamente significativas entre estos dos grupos ($t=-0.81$; p valor=0.45), sugiriendo que éste factor trófico puede intervenir *per se* en el proceso de atracción y diferenciación de oligodendrocitos (Figura R31): Implante bFGF8 $5.59\% \pm 0.66$ ($n=4$); Implante bPBS $2.04\% \pm 0.19$ ($n=4$); grupo trasplantado con MSCs $6.43\% \pm 0.99$ ($n=10$); operado Sham $2.04\% \pm 0.17$ ($n=4$).



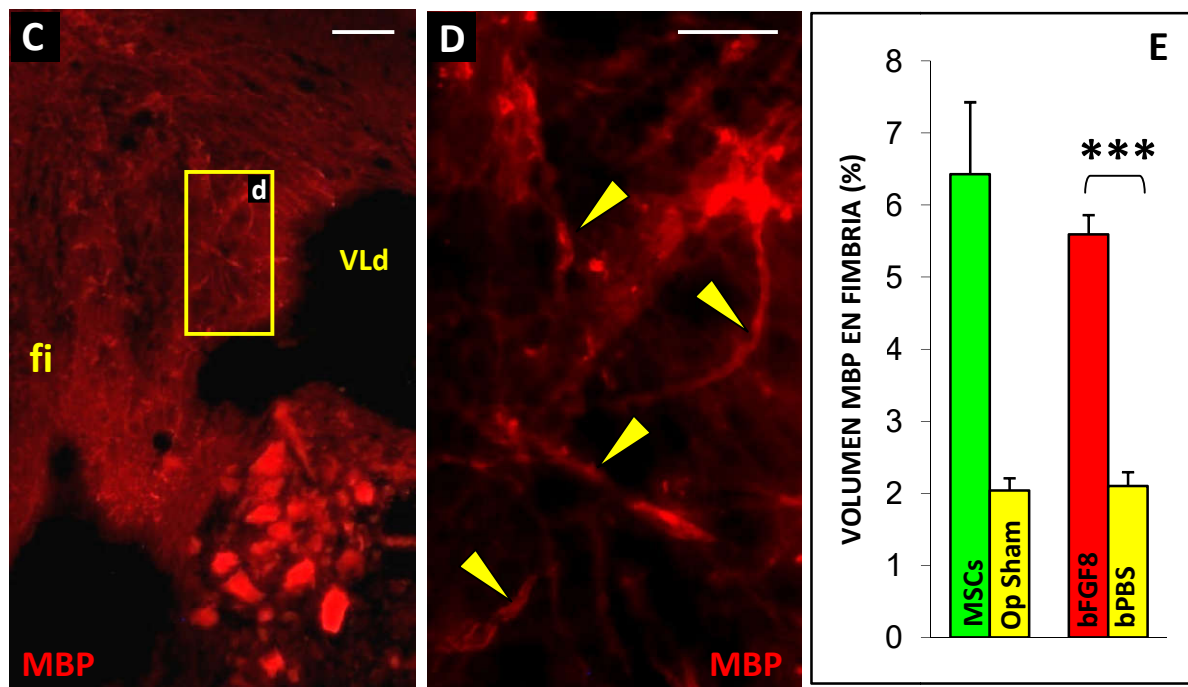


Figura R31 (junto a página anterior): Remielinización inducida por FGF8.

(A-C): Implante de bolas de heparina (estrella amarilla) embebidas en FGF8 en la fimbria (A). En la periferia del implante aparecen fibras remielinizadas, hecho que no ocurre en el grupo control (B). La remielinización sucede incluso si el implante se coloca en la periferia de la fimbria (C).

(D): Recuadro en (C) mostrando en detalle axones rodeados de mielina (puntas de flecha).

(E): Cuantificación de la expresión de MBP en el grupo trasplantado con MSCs (barra verde), Operado Sham (barra amarilla), implantado con bolas embebidas con FGF8 (bFGF8: barra roja) e implantado con bolas embebidas en PBS (bPBS: barra amarilla). Existen diferencias significativas entre el grupo implantado con bolas embebidas en FGF8 respecto al grupo control ($t=11.75$; p valor=0.0003). No hay diferencias significativas al comparar estos valores respecto a los valores obtenidos trasplantando MSCs ($t=-0.81$; p valor=0.45).

VLd/i: ventrículo lateral derecho/izquierdo; fi: fimbria. Escala: 50 μ m en A-C; 20 μ m en E. *** p <0.001

SECCIÓN B:

**TRASPLANTE DE CÉLULAS
MESENQUIMALES DE LA PULPA DENTAL Y
LIGAMENTO PERIODONTAL.**

1. - LAS CÉLULAS TRASPLANTADAS ADQUIEREN MORFOLOGÍA FUSIFORME Y MIGRAN HACIA ESTRATOS INFERIORES.

Se trasplantaron 100.000 células del ligamento periodontal (hPOL-SCs) o células de la pulpa dental humanas (hPD-SCs) resuspendidas en un volumen final de 2µl. Estas células fueron transfectadas por un plásmido que les otorga la capacidad de expresar constitutiva y ubicuamente la proteína verde fluorescente bajo el control del promotor de CMV (ver apartado 2.2 de Material y Métodos).

La cirugía se llevó a cabo sobre ratones inmunodeprimidos Hsd (Athymic Nude-Foxn1 nu/nu) que, al igual que en la sección anterior, fueron previamente tratados con Cuprizona durante doce semanas para conseguir un estado de desmielinización crónica de idénticas características.

La cirugía se realizó en la fimbria derecha en las coordenadas estereotáxicas descritas en el apartado 6.4.2 de Material y Métodos. Transcurridos 90 días tras la cirugía, las células trasplantadas adquieren una morfología fusiforme propia de células en migración, con una prolongación apical y otra caudal que se orientan paralelas al plano coronal (Figura R32A y B). Además, también es posible observar varias células con escasas y finas prolongaciones integradas en los estratos inferiores de la zona subependimaria del tercer ventrículo (Figura R32C). Llama la atención la existencia en el lugar del trasplante de cuerpos globulares autofluorescentes para todos los canales de fluorescencia (Figura R32 D-E) que corresponden a restos apoptóticos de las células trasplantadas. Esta mortalidad es mayor en el trasplante de células de la pulpa dental que el de ligamento periodontal.

En todos los casos analizados se observa un cordón de células fusiformes orientado en una misma dirección dorso-ventral siguiendo las vías córtico-medulares. Además, estas células siempre se sitúan en estratos inferiores al lugar original del trasplante, donde únicamente quedan algunas células que no han migrado junto a los restos celulares autofluorescentes. Las células trasplantadas que se integran en este cordón poseen una prolongación de avance muy desarrollada a modo de guía o sensor de migración. Además, el frente migratorio se encuentra rodeado de una matriz fibrosa N-CAM, una molécula de la matriz extracelular implicada en la adhesión durante la migración celular (Figura R33) pudiéndose observar estrechos vínculos entre las prolongaciones de avance de las células trasplantadas con dicha matriz fibrosa de N-CAM (Figura R33F).

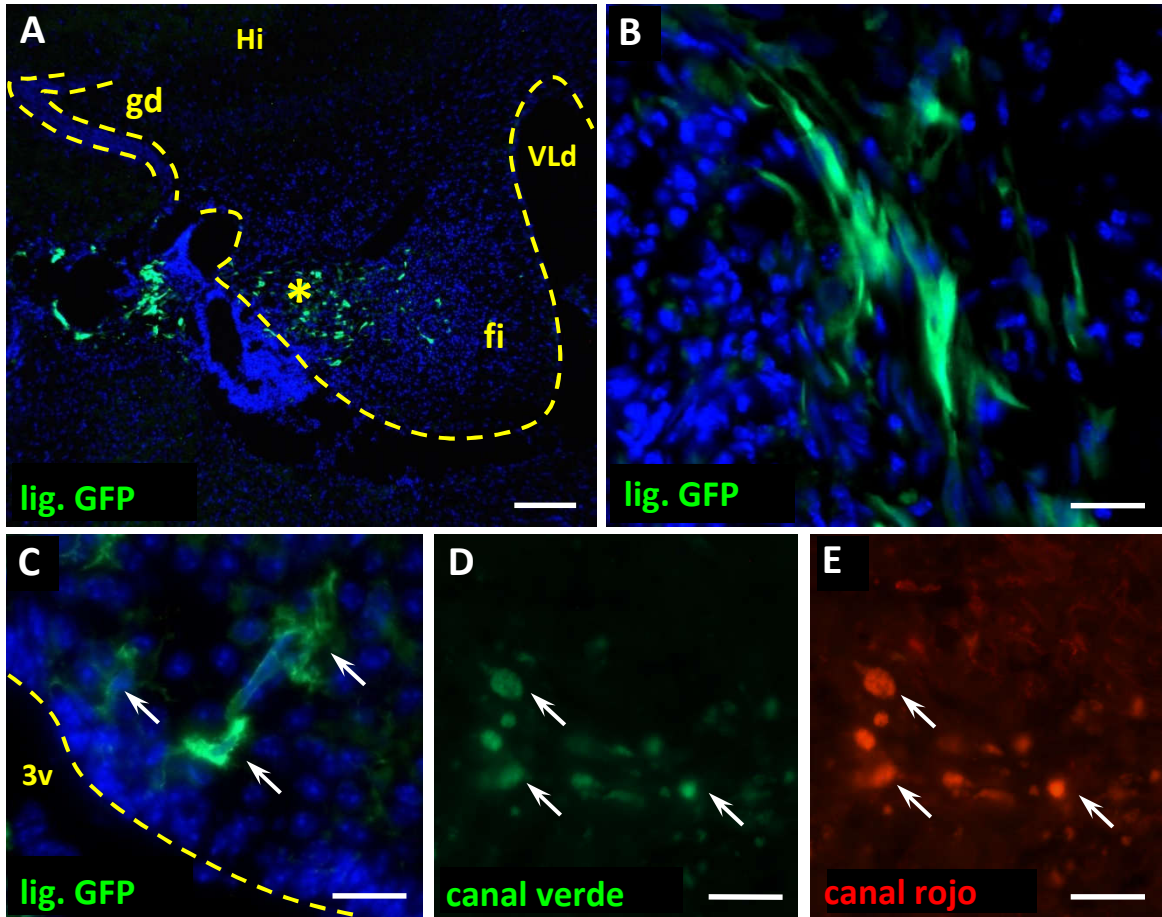


Figura R32: Características de las células trasplantadas. Localización y supervivencia.

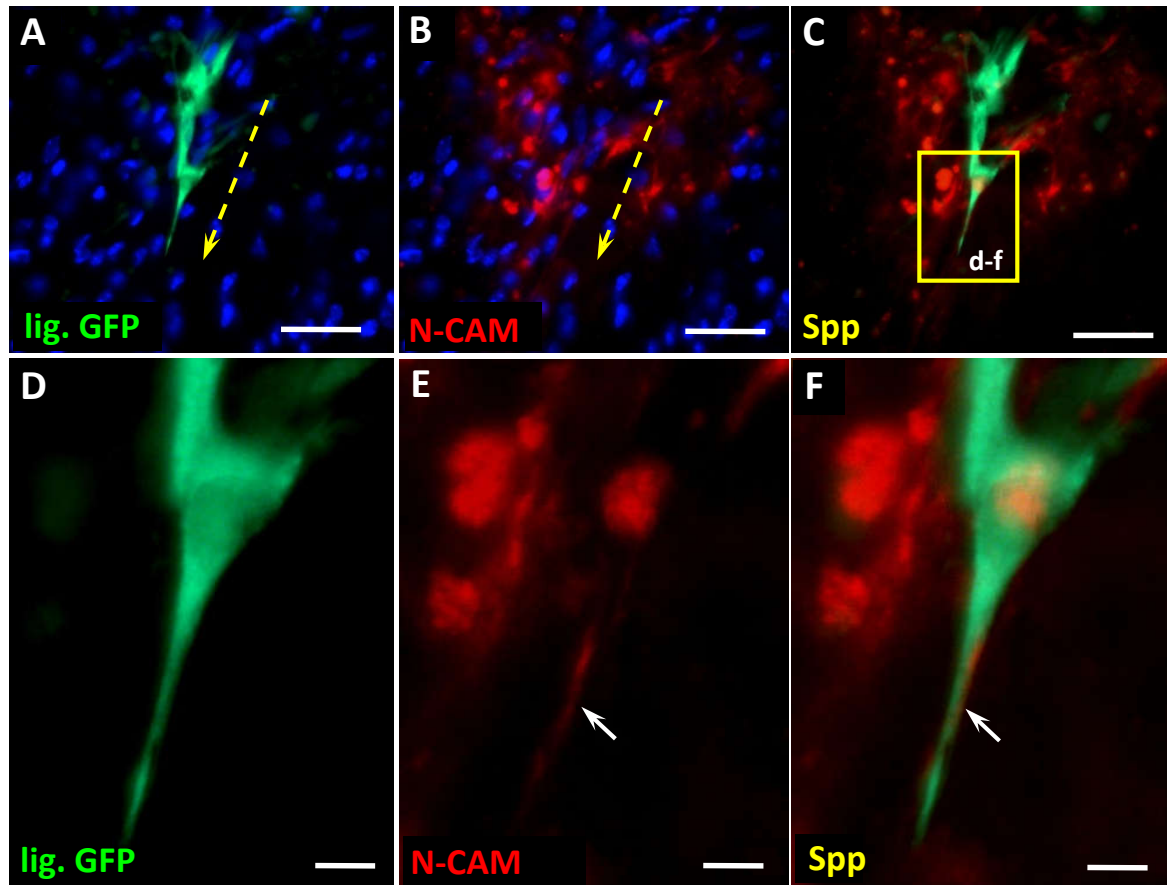
- (A): Imagen a bajo aumento del lugar de inyección de las células en la fimbria derecha (estrella).
(B): Las células trasplantadas presentan una morfología fusiforme paralelas al plano coronal.
(C): Es posible encontrar células trasplantadas en estratos ventrales próximos a la zona subependimaria del tercer ventrículo.
(D, E): En el lugar del trasplante hay restos celulares autofluorescentes para todos los canales de fluorescencia propios de apoptosis celular.

En azul tinción nuclear DAPI. Fi: fimbria; gd: giro dentado; Hi: hipocampo; VLd: ventrículo lateral derecho; lig: células del ligamento periodontal. Escala: 100 μ m en A; 25 μ m en C-E.

Figura R33 (página siguiente): Características de las células trasplantadas. Migración.

- (A-C): Las células trasplantadas migran a través de un frente de matriz extracelular formado por N-CAM (B). La flecha punteada indica la polaridad de las células.
(D-F): Detalle del recuadro en C donde se observan estrechos contactos de la matriz N-CAM y las células.

En azul tinción nuclear DAPI. Lig: células del ligamento periodontal; spp: superposición. Escala: 50 μ m en A-C; 10 μ m en D-F.



2.- ESTUDIO DE MARCADORES CELULARES.

2.1.- ESTUDIO DE MARCADORES MESENQUIMALES.

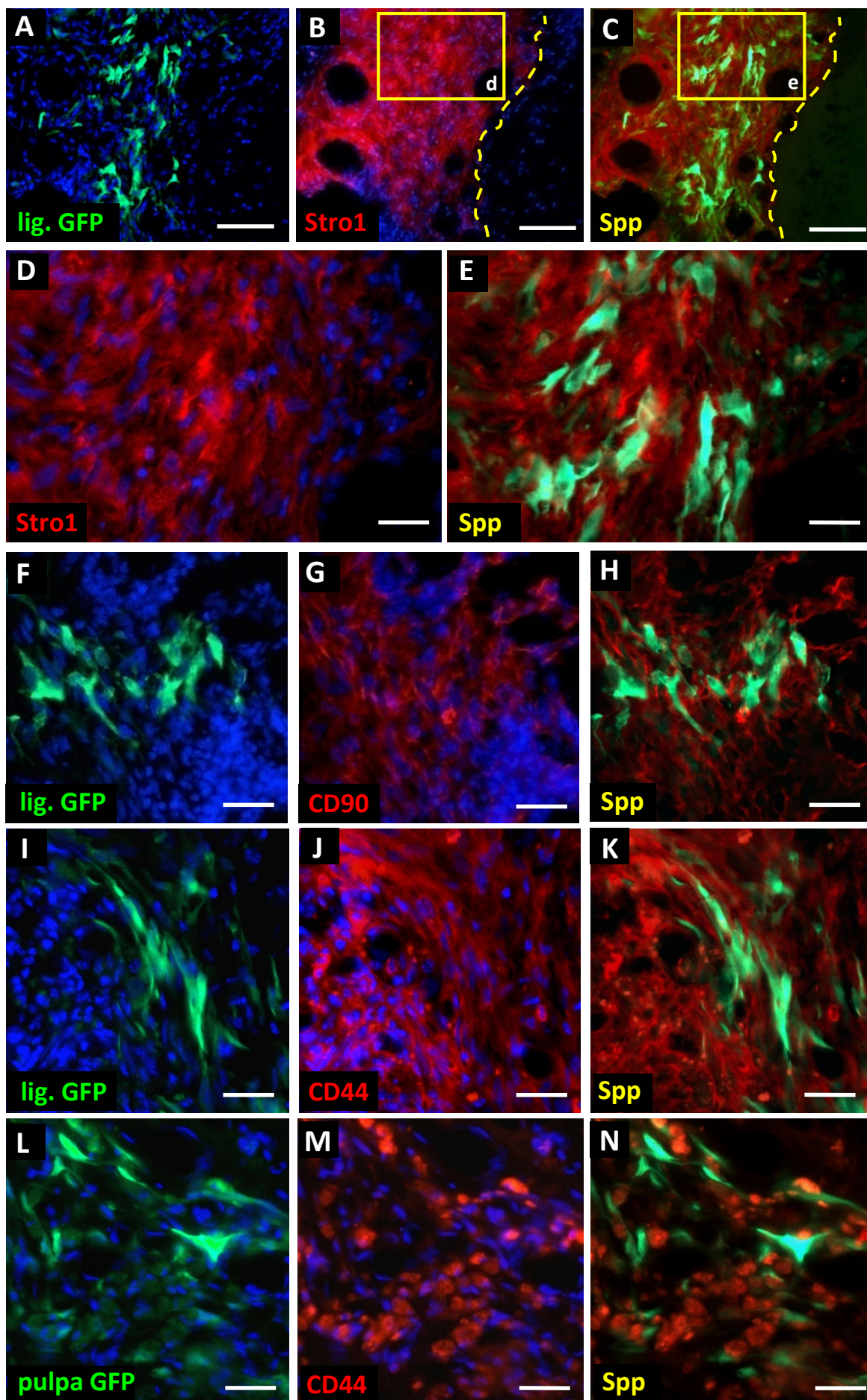
Las células del ligamento periodontal y de la pulpa dental humanas trasplantadas son inmunorreactivas para Stro1 (Figura R34 A-E), CD90 (Figura R34 F-H), y CD44 (Figura R34 I-N), moléculas que caracterizan las células de la estirpe mesenquimal propias de estos tipos celulares. El inmunomarcaje presenta unos límites muy definidos que la separan del resto de tejido nervioso (línea punteada en Figura R34B y C).

Figura R34 (página siguiente): Las células del ligamento periodontal están inmersas en una matriz de origen mesenquimal.

(A-K): Las células del ligamento periodontal se encuentran inmersas en una matriz inmunorreactiva frente Stro1 (A-E), CD90 (F-H) y CD44 (I-K), todos ellos marcadores característicos de células de la estirpe mesenquimal. Las células trasplantadas expresan débilmente éstos marcadores. La línea punteada en B y C señala el límite de ésta matriz que la separa del resto del parénquima nervioso. (D, E): detalles del recuadro en B y C respectivamente.

(L-N): Las células de la pulpa dental solo expresan débilmente el marcador mesenquimal CD44.

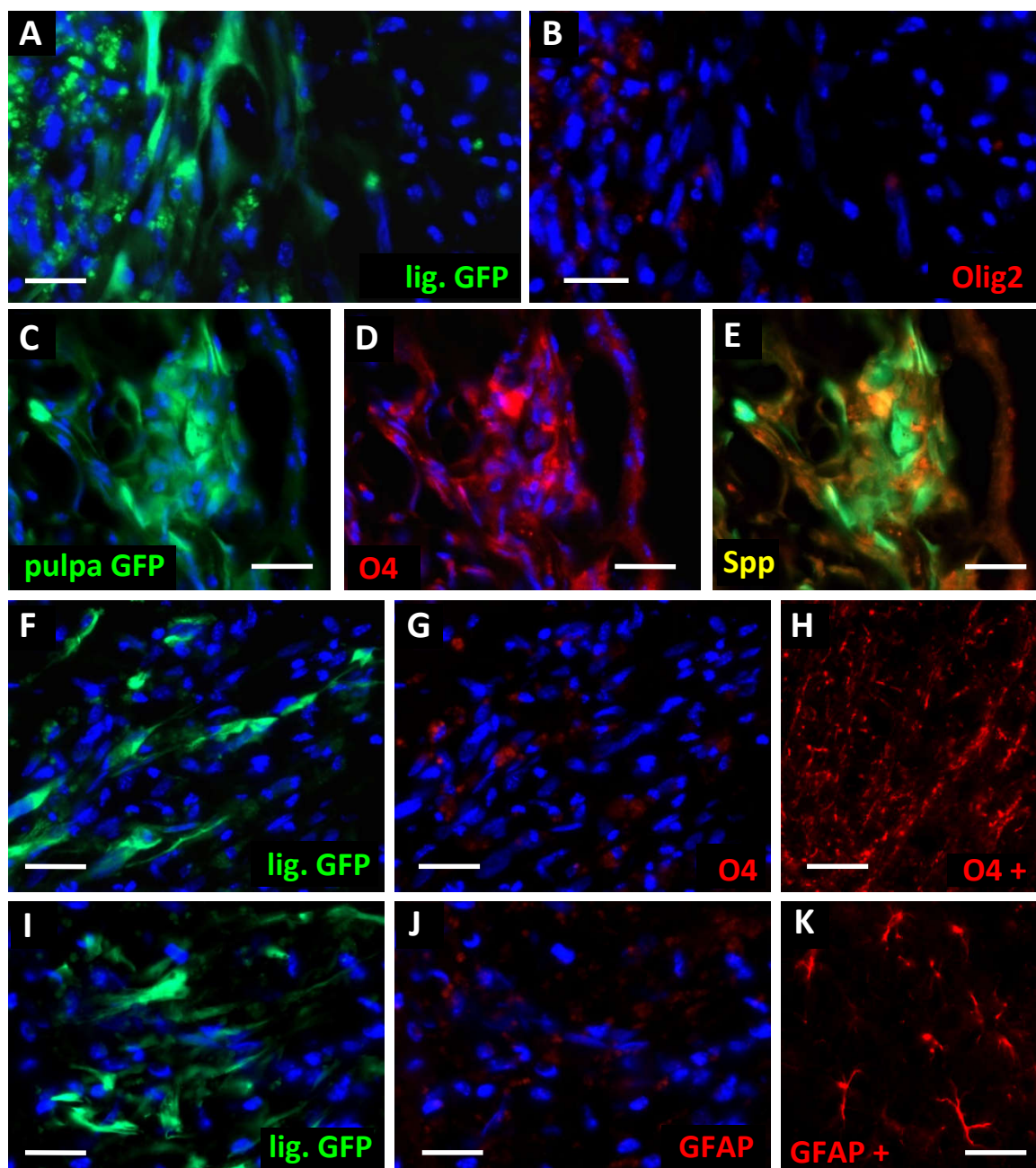
En azul marcaje nuclear con DAPI. Lig: células madre del ligamento periodontal; Spp: superposición. Escala: 75 μ m en A-C; 50 μ m en D-N.



2.2.- ESTUDIO DE MARCADORES GLIALES.

Las células de la pulpa dental y del ligamento periodontal una vez han sido trasplantadas, no expresan la proteína Olig2 característica de progenitores oligodendrocíticos (Figura R35A y B). Sin embargo, se ha visto que las células de la pulpa dental expresan la glicoproteína O4, marcador de oligodendrocitos maduros (Figura R35 C-E) mientras que las células del ligamento periodontal no son inmunorreactivas para este marcador (Figura R35 F-H).

Por otro lado, se ha comprobado que ninguno de los dos tipos celulares expresan GFAP, proteína característica del citoesqueleto de astrocitos (Figura R35 I-K). Igualmente, tampoco expresan el proteinglicano NG2, característico de los OPCs.



◀ **Figura R35** (página anterior): **Estudio de marcadores gliales.**

(A, B): Las células del ligamento periodontal y de la pulpa dental (imagen no mostrada), no expresan el marcador de oligodendrocitos inmaduros Olig2.

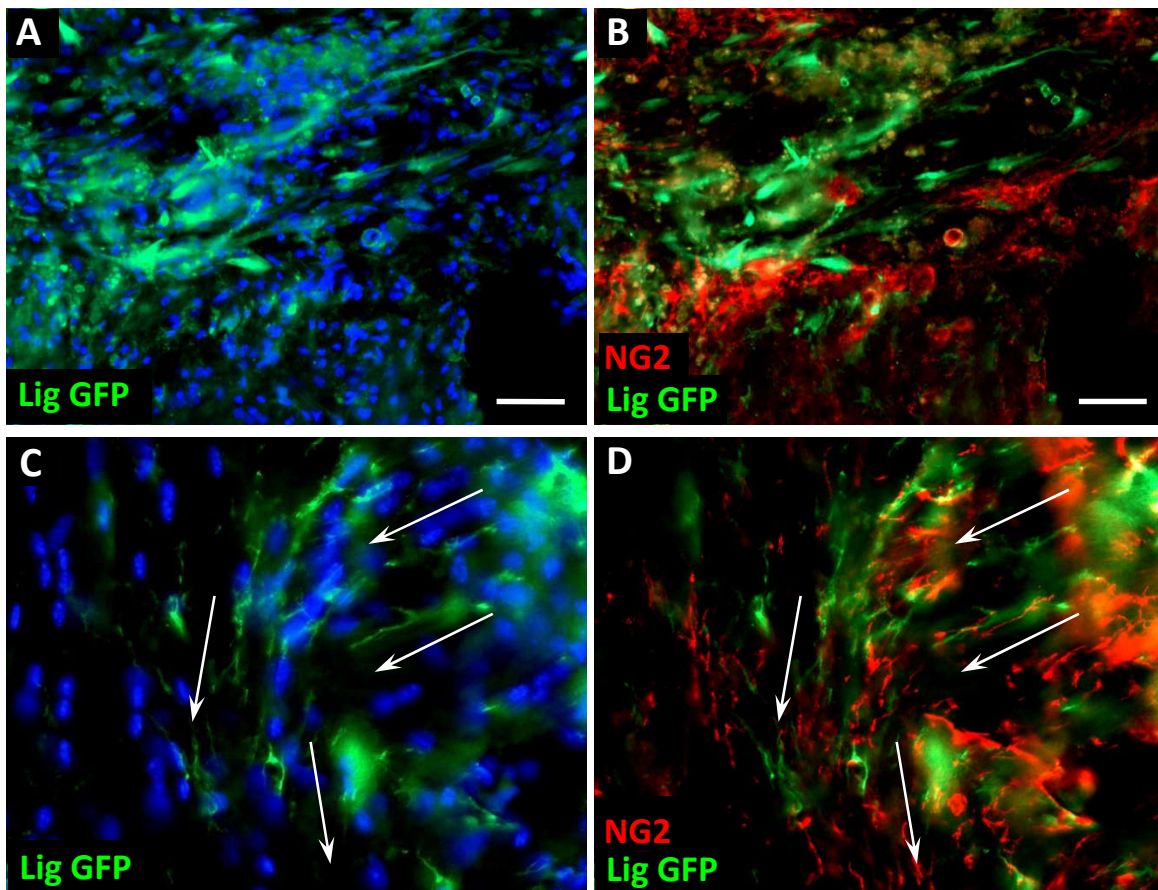
(C-H): Las células de la pulpa dental expresan la glicoproteína O4 de oligodendrocitos (C-E). En cambio, las células del ligamento periodontal no lo expresan (F, G). En H se observa un control positivo de la inmunofluorescencia frente O4 en la que se observan oligodendrocitos de axones corticales.

(I-K): Ni las células del ligamento periodontal ni de la pulpa dental (imagen no mostrada) expresan la proteína GFAP propia del citoesqueleto de astrocitos. En K se observa un control positivo de la Inmunofluorescencia frente GFAP en la que se observan astrocitos estriales.

En azul marcaje nuclear con DAPI. Lig: células madre del ligamento periodontal. Spp: superposición. Escala: 25 µm

3.- LAS CÉLULAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL EXPRESAN MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN NEURORREGENERACIÓN PERO AL IGUAL QUE LAS CÉLULAS DE LA PULPA DENTAL, NO INCREMENTAN LA MIELINIZACIÓN DE LOS ANIMALES TRASPLANTADOS.

El trasplante de células del ligamento periodontal humano se encuentra rodeado de CPOs y acompañan a las células trasplantadas durante todo su recorrido migratorio hacia estratos inferiores entremezclándose con ellas (Figura R36).



◀ **Figura R36 (página anterior): Potencialidad remielinizante del trasplante I.**

(A, B): Las células del ligamento periodontal se encuentran rodeadas por CPOs NG2+ en el lugar de inyección.
 (C, D): Las CPOs acompañan a las células trasplantadas en su trayecto migratorio hacia estratos basales. Las flechas sugieren el desplazamiento desde el lugar de inyección.
 En azul tinción nuclear DAPI. Escala: 50 µm en A, B; 25 µm en C, D.

Sin embargo, pese a la existencia de CPOs en la periferia del trasplante de células del ligamento periodontal y de pulpa dental, no hay un aumento de la mielinización de las zonas periféricas al mismo, ni en el punto original de inyección, ni durante su trayecto migratorio a estratos inferiores, siendo no significativas las diferencias observadas entre estos grupos con el Operado Sham y los grupos Control (Figura R37).

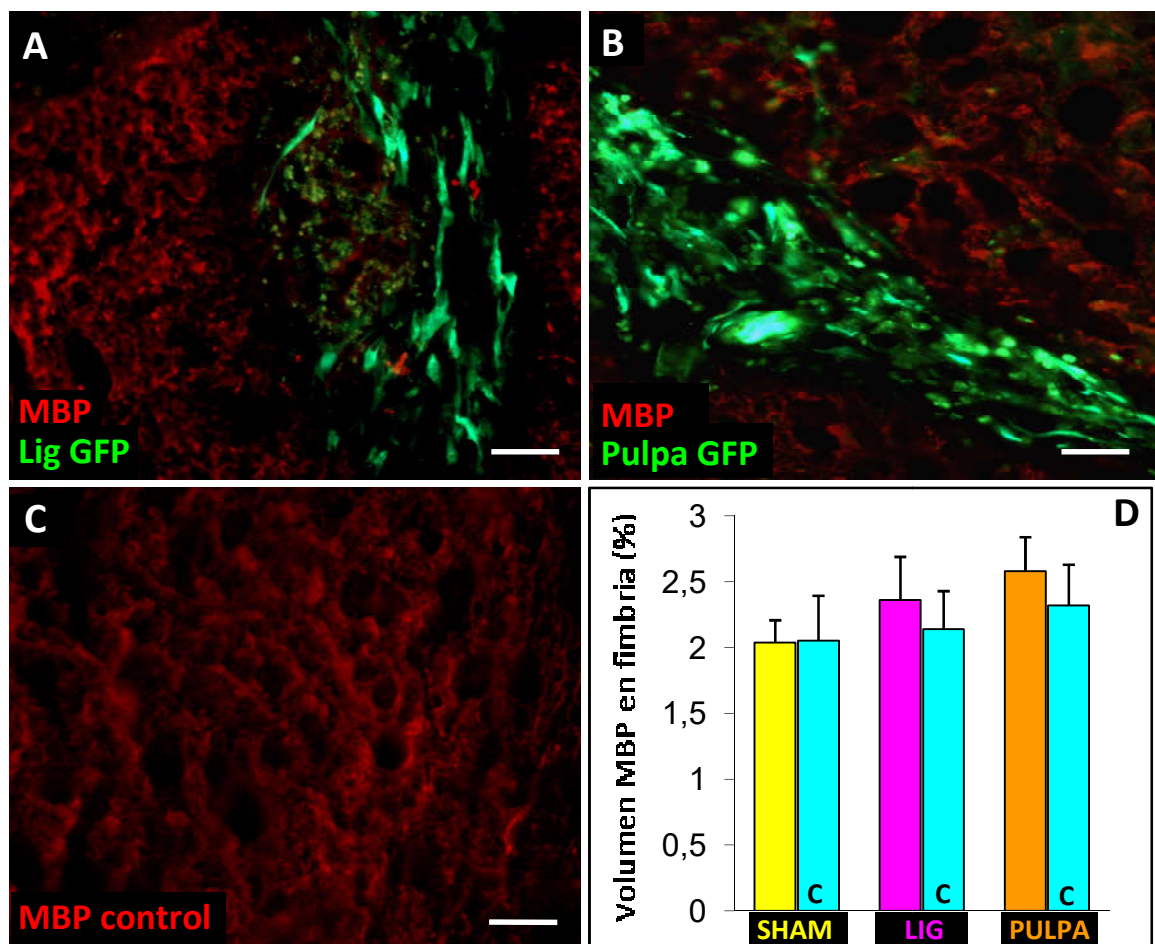


Figura R37: Potencialidad remielinizante del trasplante II.

Las células del ligamento periodontal (A) y de la pulpa dental (B) no promueven la remielinización de la zona trasplantada, pues no se observan diferencias al comparar con el grupo control (C) ni con el grupo Operado Sham.
 (D): Histograma en el que se muestran los valores de remielinización para el grupo Operado Sham (barra amarilla: 2.04% ± 0.17); grupo trasplantado con células del ligamento periodontal (barra magenta: 2.36% ± 0.33); grupo trasplantado con células de la pulpa dental (barra naranja: 2.58% ± 0.26); y sus respectivos grupos control (barras azules). No se observan diferencias significativas en los niveles de remielinización respecto al grupo Operado Sham, ni respecto a sus grupos control. Escala: 50 µm.

Por otro lado, algunas células del ligamento periodontal expresan el marcador de células progenitoras neurales inmunorreactivas para Nestina al ser trasplantadas en el SNC (Figura R38A y B). Además, el interior del trasplante de ligamento periodontal es invadido por colaterales axónicos (Figura R38 C-E).

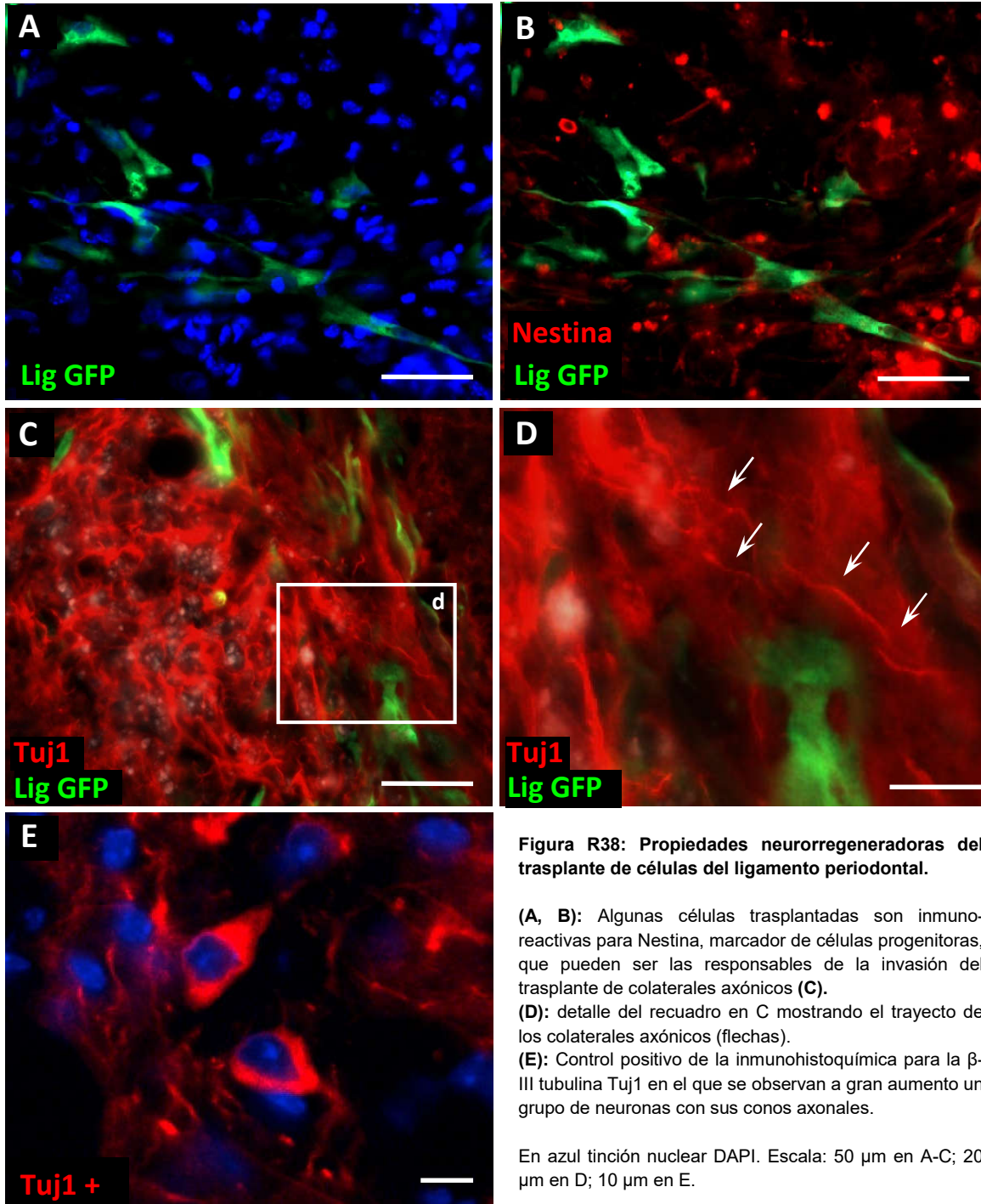


Figura R38: Propiedades neuroregeneradoras del trasplante de células del ligamento periodontal.

(A, B): Algunas células trasplantadas son inmunorreactivas para Nestina, marcador de células progenitoras, que pueden ser las responsables de la invasión del trasplante de colaterales axónicos (C).

(D): detalle del recuadro en C mostrando el trayecto de los colaterales axónicos (flechas).

(E): Control positivo de la inmunohistoquímica para la β -III tubulina Tuj1 en el que se observan a gran aumento un grupo de neuronas con sus conos axonales.

En azul tinción nuclear DAPI. Escala: 50 μ m en A-C; 20 μ m en D; 10 μ m en E.

SECCIÓN C:

TRASPLANTE DE OLIGODENDROCITOS
INMORTALIZADOS.

1.- LAS CÉLULAS 158N FORMAN UNA MASA CELULAR VASCULARIZADA E INVADEN LA FIMBRIA Y ESTRUCTURAS VECINAS.

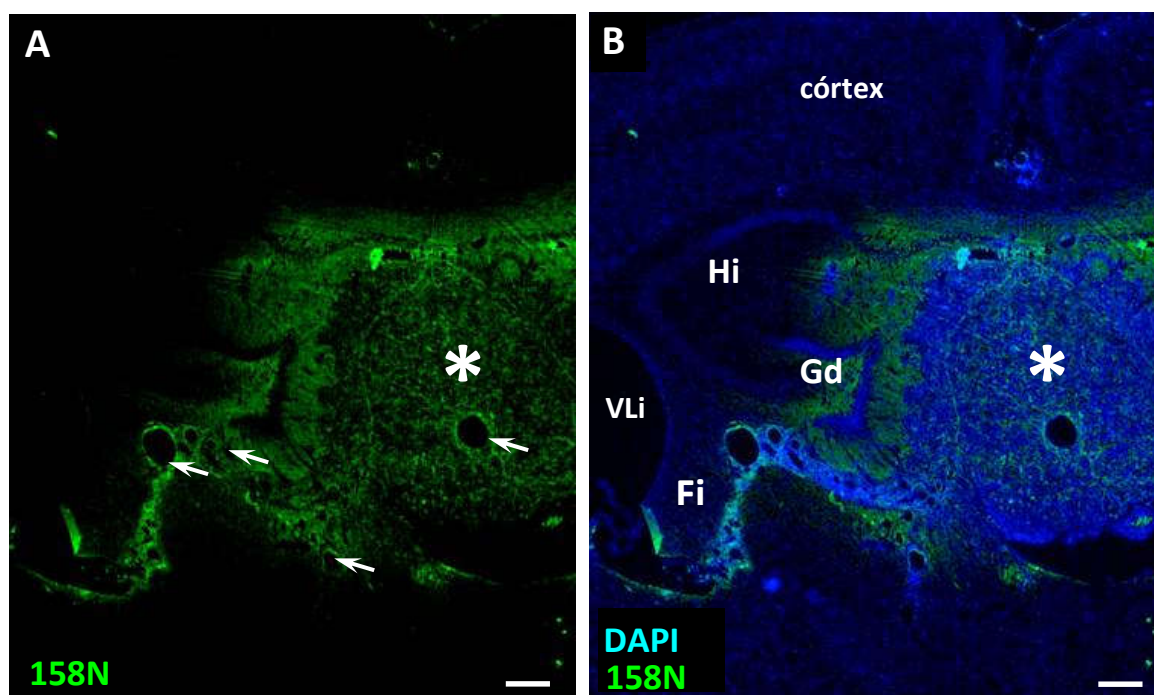
Se trasplantaron 300.000 células 158N resuspendidas en un volumen final de 2 μ l. Estas células se presentan el complejo mayor de histocompatibilidad H2D^b.

La cirugía se llevó a cabo sobre ratones de la cepa Swiss C3H/He con el complejo mayor de histocompatibilidad H-2 (H2K^k) que fueron previamente tratados con Cuprizona durante doce semanas para conseguir un estado de desmielinización crónica.

Las células trasplantadas se localizaron mediante la inmunodetección del haplotipo H2D^b permitiendo su diferenciación respecto a las células del huésped de haplotipo H2K^k.

El trasplante se encuentra en la fimbria del hipocampo en las coordenadas descritas en el apartado 6.4.2 de Material y Métodos, extendiéndose por los ventrículos laterales y los plexos coroideos. En algunos casos, las células invaden parte de la fimbria y giro dentado del hipocampo ipsilateral (Figura R39A y B). En la periferia del trasplante, las células se integran con el tejido del huésped aumentando la celularidad de la fimbria. Además se observa invasión celular en la periferia del giro dentado del hipocampo.

En el interior del trasplante se observan núcleos picnóticos indicando que existe muerte celular posiblemente a un déficit de aporte vascular en la zona central del trasplante (Figura R39C).



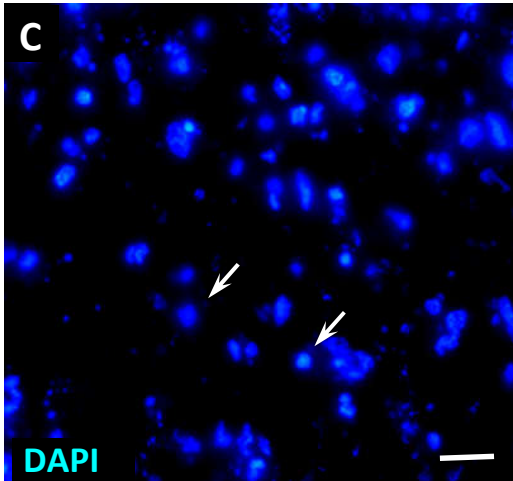


Figura R39 (junto a página anterior): **Características histológicas del trasplante de oligodendrocitos 158N.**

(A-B): Imagen panorámica del lugar de trasplante (estrella) de las células 158N en la fimbria derecha. En el caso experimental mostrado, las células invaden estructuras vecinas entre ellas el hipocampo contralateral, la parte medial de la fimbria contralateral y los plexos coroideos de los ventrículos laterales. Existe una gran actividad angiogénica para irrigar la masa trasplantada (flechas en A).

(C): Detalle de la parte central del trasplante en la que se observa degeneración celular con abundancia de cuerpos picnóticos (flechas).

Fi: fimbria; Gd: giro dentado; Hi: hipocampo; VLi: ventrículo lateral izquierdo. Escala: 100 μ m en A, B; 20 μ m en C.

2.- LAS CÉLULAS TRASPLANTADAS CONSERVAN SUS CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS BÁSICAS PREVIAS AL TRASPLANTE PERO EXPRESAN GFAP Y TUJ1.

Al realizar el trasplante se observa un número reducido de células positivas para Ca-II (anhidrasa carbónica II) y OLIG2 (Figura R40A-C), ambos son marcadores de oligodendrocitos inmaduros lo cual permite la identificación de estas células en sus primeros estadios de diferenciación.

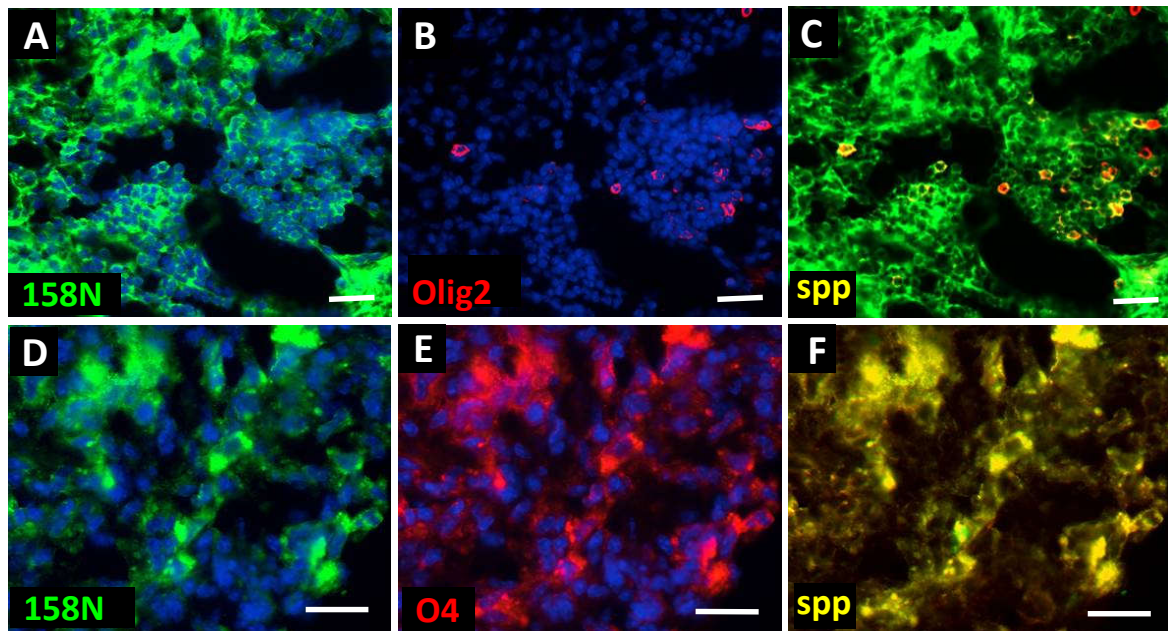
Por otro lado, las células trasplantadas muestran inmunorreactividad para la glicoproteína O4 (Figura R40D-F), la proteína básica de mielina (MBP) y la proteína proteolipídica de mielina (PLP), los tres son marcadores de oligodendrocitos maduros.

Sin embargo, las células trasplantadas no mostraron inmunorreactividad para la proteína de unión a calcio S100 (Imagen no mostrada), característica de las células de Schwann, encargadas de la formación de la mielina en los axones del sistema nervioso periférico.

Estos resultados inmunohistoquímicos sugieren que las células trasplantadas no ven alterado su patrón expresión de marcadores básicos propios de la línea de progenitores oligodendrocíticos 158N que presentaban previamente a la realización del trasplante.

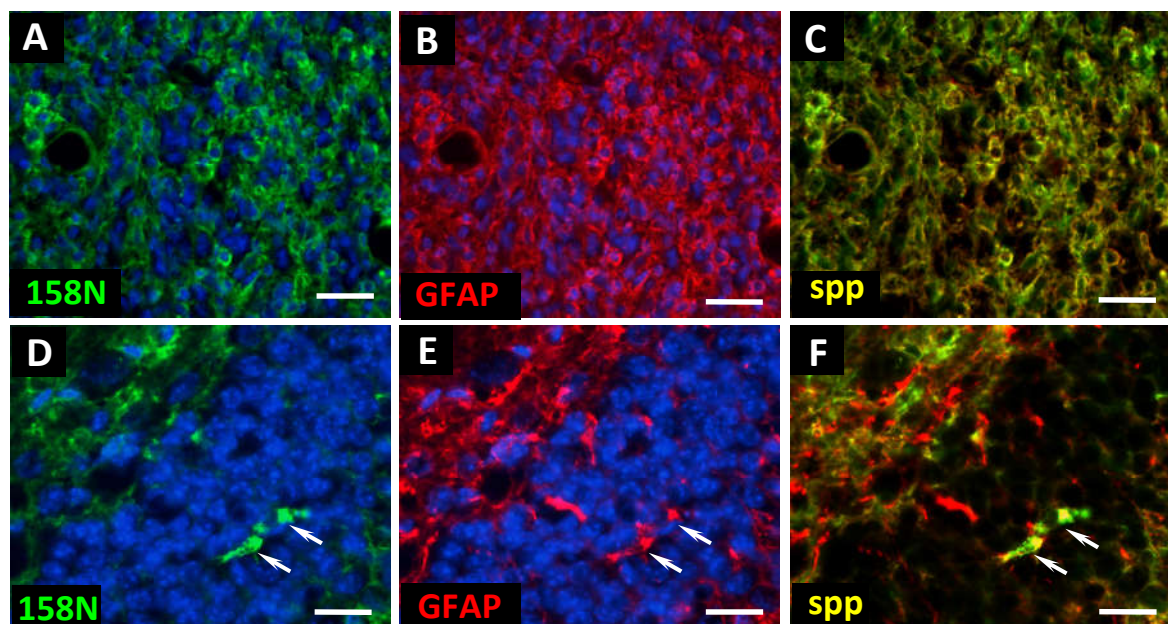
Figura R40 (página siguiente): **Características inmunohistoquímicas del trasplante de células 158N I.**

(A-F): Detalle del trasplante en el que se observa como solo un $8\% \pm 3$ de las células de la línea 158N presentan inmunorreactividad para el marcador de progenitores de oligodendrocitos Olig2 (A-C). Sin embargo, el 100% de ellas presentan marcadores de oligodendrocitos maduros como O4 (D-F). En azul: tinción nuclear con DAPI. Spp: superposición. Escala: 50 μ m.



Sin embargo, al ser trasplantadas adquieren un inmunofenotipo diferente al que presentan en cultivo, siendo característica la expresión del filamento intermedio GFAP, que es característico del citoesqueleto de las células del linaje astrogliar o de la glía envolvente olfatoria, mientras que los oligodendrocitos carecen él (Figura R41A-F). Igualmente, Tuj1 una β -tubulina neural de la clase III presente en el citoesqueleto de axones neurales y neuroblastos, también aparece sobreexpresado en las células trasplantadas (Figura R41G-I).

Además, las células trasplantadas también expresan semaforina 3F, una molécula implicada en la guía axonal y en la migración y diferenciación de células oligodendrogiales (Figura R41J-L).



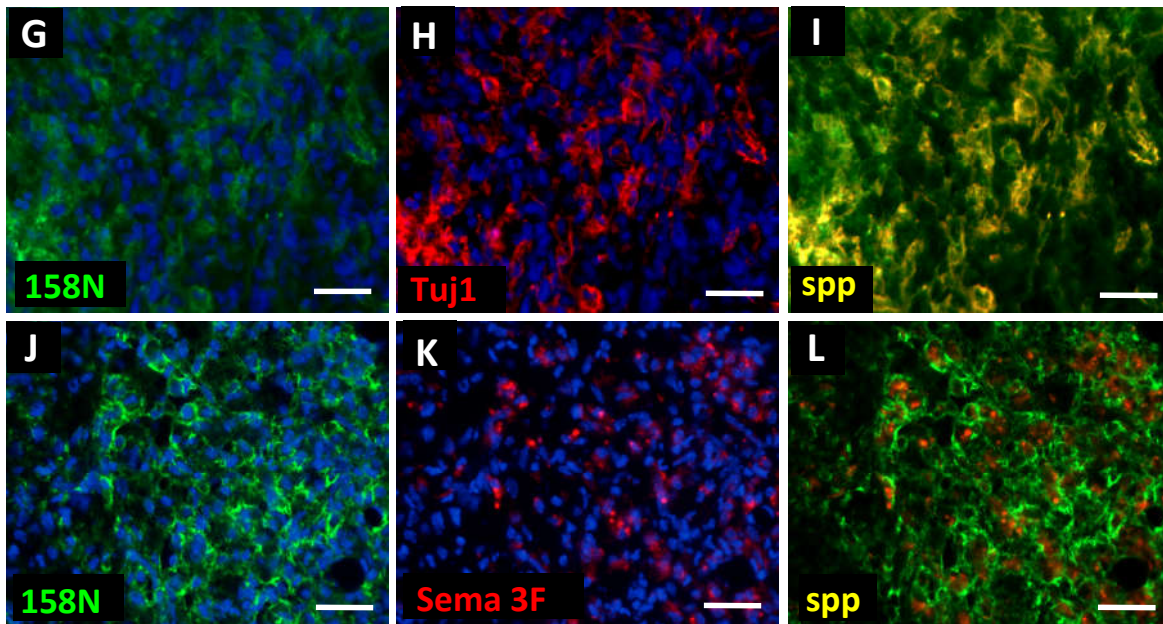


Figura R41: Características inmunohistoquímicas del trasplante de células 158N II.

(A-C): Las células trasplantadas expresan GFAP.

(D-F): En algunos casos se observan células 158N que han migrado al giro dentado donde igualmente expresan GFAP (flechas).

(G-I): expresión de Tuj1 *de novo* en las células trasplantadas.

(J-L): El $53\% \pm 11$ de las células trasplantadas expresan Sema3F.

En azul tinción nuclear con DAPI. Spp: superposición. Escala: 50 μm .

3.- EL TRASPLANTE ACTIVA LA DIFERENCIACIÓN DE PROGENITORES NEURALES A CÉLULAS PROGENITORAS DE OLIGODENDROCITOS Y PROMUEVEN SU MIGRACIÓN.

Tanto la periferia del trasplante como su interior es invadido por CPOs estableciendo contactos estrechos con las células trasplantadas (Figura R42A). Estas células carecen del haplotipo H2d^b, por lo que son células propias del huésped. Histológicamente, estas células provienen del giro dentado del hipocampo que se muestra hiperactivada en hemisferio de la fimbria trasplantada (Figura R42B-D).

Igual a lo observado en la sección A de resultados, en el grupo Operado Sham se observa un pequeño incremento en la reactividad de NG2 periférico al lugar de inyección, característico, junto con la reacción astrogliar, de uno de los mecanismos regenerativos que posee el tejido nervioso ante una lesión.

Sólo un bajo número de células trasplantadas parecen expresar el proteoglicano NG2 ($3\% \pm 1$), lo que sugiere que la línea celular 158N es una línea de oligodendrocitos maduros con escasa capacidad de regresión a CPOs (Figura R42E-G).

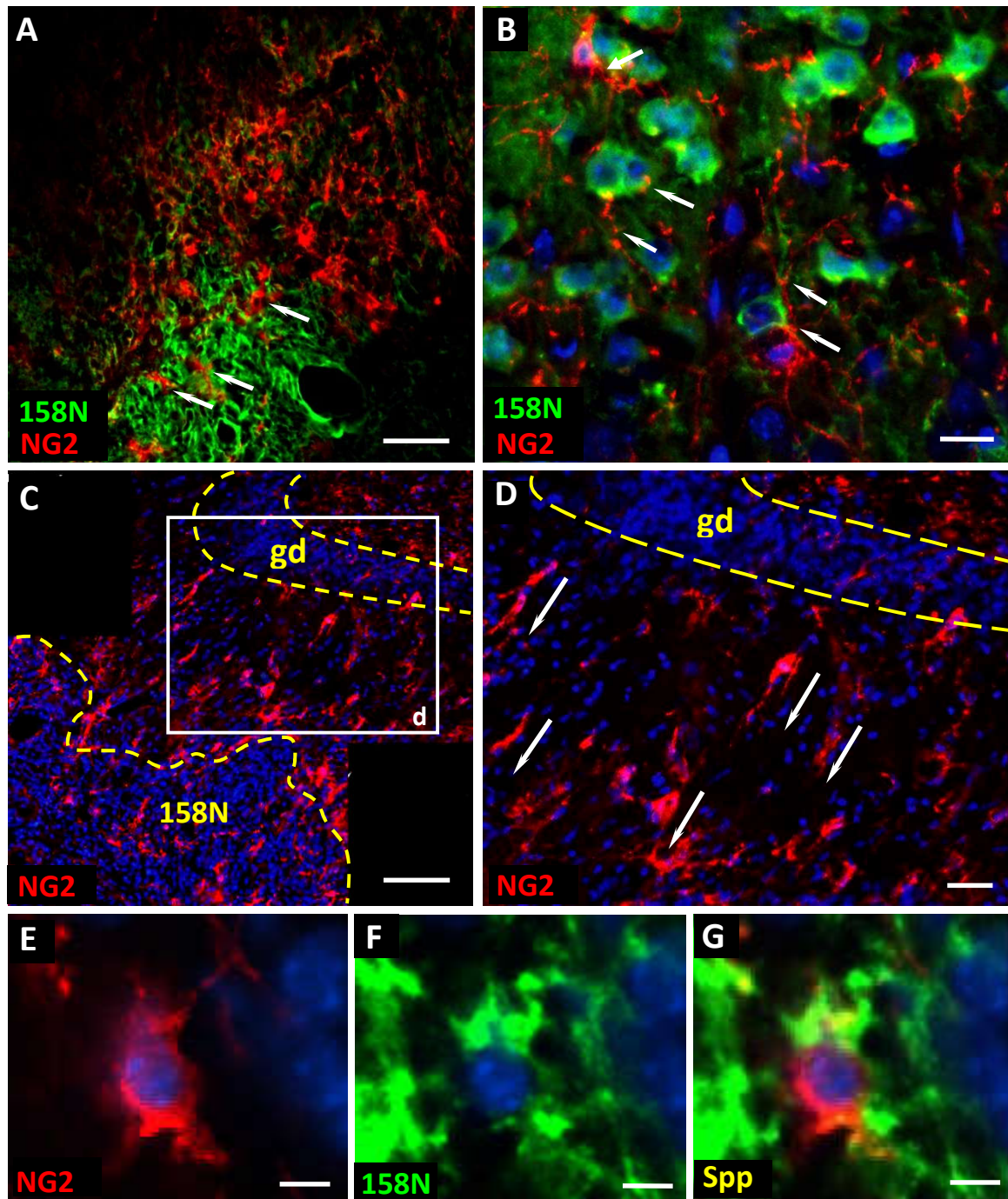


Figura R42: Activación y migración de progenitores neurales.

(A): El trasplante de células 158N es rodeado por células NG2. Algunas de estas células invaden la masa celular trasplantada (flechas).

(B): Las células 158N y las CPO presentan estrechos vínculos citoplasmáticos.

(C): Imagen reconstruida en la que se muestra la hiperactivación del giro dentado del lado trasplantado y sus relaciones con el área trasplantada. El giro dentado es una zona neurogénica desde donde las CPO se diferencian a partir de células progenitoras. Estas células adquieren una morfología polarizada típica en células migratorias orientándose en dirección a la zona trasplantada.

(D): Detalle del recuadro en C. Las flechas señalan la polaridad de las células desde el giro dentado al trasplante.

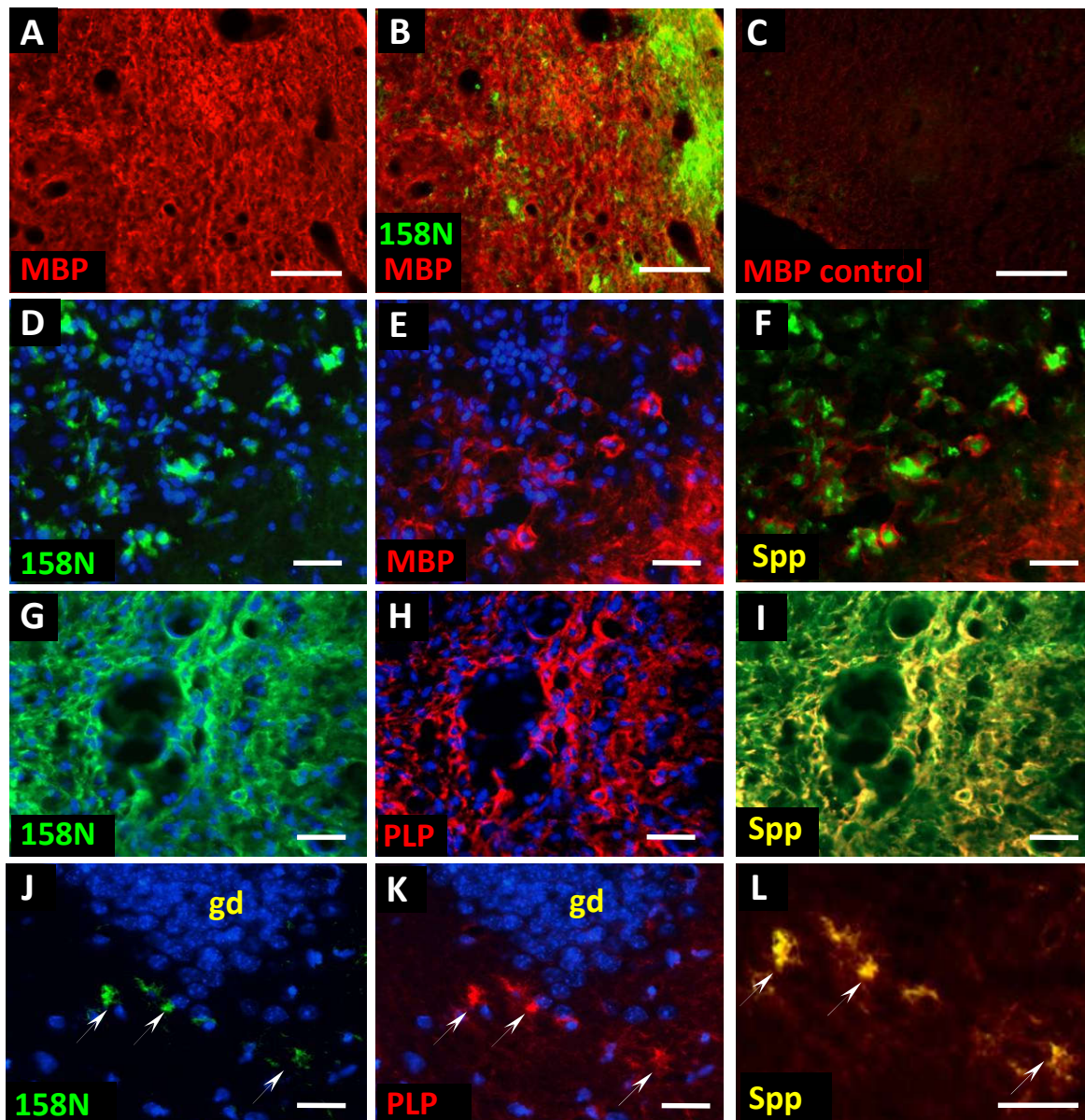
(E-G): Un pequeño número de células trasplantadas ($3\% \pm 1$) expresan el proteoglicano NG2 propio de las CPO.

Gd: giro dentado; Spp: superposición. En azul tinción nuclear DAPI. Escala: 75 μm en A; 20 μm en B; 100 μm en C; 50 μm en D; 10 μm en E-F.

4.- EL TRASPLANTE DE CÉLULAS N158 REMIELINIZA LA FIMBRIA TRASPLANTADA.

Tanto en el lugar que ocupan las células trasplantadas como en la periferia del mismo, aumenta la inmunorreactividad para las proteínas mayoritarias de la mielina (MBP y PLP) (Figura R43A y B). En el grupo Control la producción de proteínas de mielina después del tratamiento desmielinizante es prácticamente inexistente (Figura R43C). Igual sucede en el grupo Operado Sham.

Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con el trasplante de MSCs, la producción de mielina es consecuencia de la diferenciación y actividad de las células trasplantadas 158N (Figura R43 D-I). Algunas células trasplantadas se localizaron en el hipocampo, donde igualmente expresan proteínas de mielina (Figura R43 J-L).



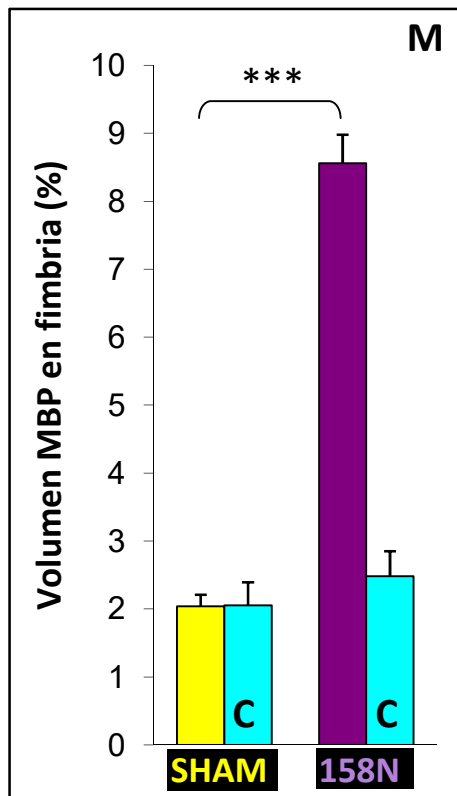


Figura R43 (junto a página anterior): **Remielinización de la zona trasplantada.**

(A, B): Tanto en la zona trasplantada como en su periferia hay un incremento en la producción de MBP. Esto se debe a la producción de mielina de las células trasplantadas y de las CPOs atraídas. Este efecto no se observa en la fimbria control (C).

Las células trasplantadas expresan MBP (D-F) y PLP (G-I), indicando que ellas las responsables de la producción de mielina.

(J-L): Algunas células trasplantadas parecen haber migrado a hipocampo donde también expresan PLP (flechas). Gd: giro dentado. Spp: superposición.

(M): Histograma en el que se muestran los valores de remielinización para el grupo Operado Sham (barra amarilla: 2.04% ± 0.17); grupo Trasplantado con células 158N (barra morada: 8.56% ± 0.42); y sus respectivos grupos Control (barras azules). Se observan diferencias significativas respecto al grupo Operado Sham (p valor = 0.0009), y respecto a su grupos control.

En azul tinción nuclear DAPI. Escala: 50 µm. ***p<0.001.

DISCUSIÓN

Se han trasplantado varios tipos celulares con propiedades neuroregeneradoras en un modelo de desmielinización crónica para estudiar *in vivo* su potencial remielinizante: células mesenquimales (MSCs), células del ligamento periodontal (hPOL-SCs), células de la pulpa dental (hPD-SCs) y oligodendrocitos inmortalizados (158N).

Como resultado de esta tesis doctoral se ha observado que las MSCs estimulan, mediante la liberación de factores tróficos, la proliferación, atracción y diferenciación de progenitores neurales quiescentes originarios de los nichos neurogénicos del encéfalo desmielinizado: en concreto, la zona subventricular o subependimaria de los ventrículos telencefálicos (SVZ) y la capa granular del giro dentado del hipocampo.

Los progenitores oligodendrogiales activados NG2+ se diferencian en oligodendrocitos que finalmente remielinizan los axones periféricos al trasplante de MSCs. Ésta recuperación histológica se acompaña de una recuperación funcional axonal mediante el incremento en la velocidad de conducción del impulso nervioso en los axones remielinizados por efecto del trasplante.

Además, hemos demostrado *in vivo* el papel que desempeña FGF8 en el proceso de remielinización como parte fundamental del conjunto de factores tróficos sintetizados y liberados por las MSCs, y que es capaz de activar el complejo proceso de la remielinización.

En cuanto a las células del ligamento periodontal y la pulpa dental, pese a que igualmente atraen progenitores NG2+ a la zona periférica del trasplante, éstos no son capaces de diferenciarse a oligodendrocitos maduros capaces de sintetizar y envolver axones con mielina.

Por último, cabe mencionar que el trasplante de oligodendrocitos inmortalizados 158N, pese a conseguir un nivel de remielinización superior al resto de los tipos celulares estudiados, quedan descartados en su uso en terapia por su potencial formación de tumores.

1.- VIABILIDAD DEL TRASPLANTE DE MSCs DENTRO DE UN AMBIENTE NEURAL DESMIELINIZADO.

Las MSC trasplantadas en el SNC crónicamente desmielinizado, son viables después de 90 días tras la cirugía. Estas células sobreviven y se integran en el SNC. Además, estas células se encuentran transcripcionalmente activas y no forman masas tumorales pues pierden su capacidad proliferativa al ser trasplantadas en tejido nervioso al mantener la capacidad de inhibición de proliferación por contacto, convirtiéndolas en una herramienta viable en su uso clínico.

Las MSCs trasplantadas estimulan la proliferación y diferenciación de progenitores neurales endógenos mediante el establecimiento de comunicaciones intercelulares entre diferentes poblaciones de células madre (Zhang et al., 2004). En el presente trabajo, las MSCs que durante el proceso de inyección refluieron a los ventrículos telencefálicos y se incorporaron en el subependimo (ver Resultado 1 de la sección A), se encuentran físicamente unidas a otras células progenitoras propias de estos nichos y que, si se cultivan en medio neurogénico tienen la capacidad de formar neuroesferas. Las uniones formadas entre la célula progenitora subependimaria y la MSC es lo suficientemente fuerte como para resistir los procesos de disgregación mecánica y enzimática realizados durante el proceso de obtención de neuroesferas. Además, el hecho de que las MSCs adheridas no sean capaces de formar neuroesferas en estas condiciones indica que no poseen la capacidad de transdiferenciarse a progenitores neurales en el nicho neurogénico.

Sin embargo, hemos observado que un pequeño porcentaje de MSCs expresan la proteína de mielina PLP. A la par de estos resultados, algunos autores han descrito la capacidad de las MSCs para expresar proteínas de mielina como parte de su actividad inmunorreguladora a modo de células presentadoras de antígenos (Földes et al., 2016) e incluso adquirir cierta capacidad remielinizadora sin necesidad de inducción en medios neurogénicos (Vellosillo et al., 2017). Sin embargo, éste es un suceso que en nuestro caso ocurre de forma excepcional y que no explicaría por sí mismo la remielinización observada en los animales trasplantados en este estudio.

Por otro lado, la fusión celular descrita en nuestros trabajos previos (Jones et al., 2010) queda descartada como responsable del incremento de supervivencia de oligodendrocitos, pues aunque hemos observado células fusionadas, es un fenómeno que ocurre de manera muy escasa y dispersa y por tanto no parece ser responsable de la remielinización (la mayoría de células NG2+ son del receptor y no expresan marcadores del donante). Por tanto, el neurotrofismo mediado por los factores sintetizados y liberados por las MSCs constituye la causa más probable de los efectos remielinizantes observados.

En estudios previos de nuestro laboratorio se trasplantaron células madre hematopoyéticas de médula ósea enriquecida con células CD117+ mediante selección celular o cell-sorter, en ratones neonatos (Bonilla et al., 2005). Estas células tenían la capacidad de integración en la zona subventricular (SVZ) y después de 30 días, eran capaz de activarse y migrar a zonas que habían sido desmielinizadas mediante una inyección intraparenquimal de lisolecitina. Una vez las células habían accedido al lugar de la lesión, adquirían la capacidad de transdiferenciación a células con características inmunofenotípicas de oligodendrocitos que además, eran capaces de envolver los axones desmielinizados. Sin embargo, se vio que este evento se produjo en un escaso porcentaje de células trasplantadas y desaparecía con el paso del tiempo.

Por tanto, el uso de MSCs como terapia para tratar lesiones desmielinizantes parece ser una herramienta terapéutica más viable y de mayor potencialidad remielinizante que las células madre hematopoyéticas CD117+. La capacidad neurotrófica del secretoma de las MSCs es capaz de activar las zonas neurogénicas propias del tejido nervioso lesionado, dirigir la diferenciación de estos progenitores endógenos hacia la línea oligodendroglial y atraerlos selectivamente al lugar donde se ha realizado el trasplante. Además, la mayor tasa de supervivencia del trasplante de MSCs las convierte en una realidad terapéutica frente a enfermedades crónicas (Cohen, 2013; Connick et al., 2011; Connick et al., 2012; Harris et al., 2018; Karussis et al., 2010; Uccelli et al., 2019).

2.- EL TRASPLANTE DE MSCs PROMUEVE REMIELINIZACIÓN MEDIANTE LA ATRACCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS DE OLIGODENDROCITOS: CORRIENTE MIGRATORIA CAUDAL.

2.1.- SOBRE LOS PROGENITORES DE OLIGODENDROCITOS.

Los modelos de desmielinización basados en el uso de sustancias tóxicas para los oligodendrocitos como la cuprizona, bromuro de etidio o la lisolecitina, se asemejan a las lesiones tempranas que ocurren en la esclerosis múltiple (EM) donde hay una apoptosis masiva de oligodendrocitos. Sin embargo, al suspender prematuramente el tratamiento desmielinizante, se revierte la desmielinización al activarse los mecanismos fisiológicos de remielinización (Franklin & French-Constant, 2008).

Por otro lado, en los modelos autoinmunes de EM como la encefalopatía autoinmune esclerosante, se crea un ambiente desfavorable que afecta tanto a los oligodendrocitos como a susprogenitores (CPOs). En este modelo, el proceso de remielinización ocurre de forma paralela a la lesión autoinmune desmielinizante (Franklin & French-Constant, 2008).

Esta remielinización fisiológica llevada a cabo por CPOs ocurre en tres fases que se regulan por complejos mecanismos de expresión de moléculas de señalización que actúan coordinados entre sí (Chari, 2007):

- 1) Proliferación y colonización de las áreas desmielinizadas por CPOs.
- 2) Diferenciación de CPOs a oligodendrocitos inmaduros que contactan con axones desmielinizados.
- 3) Una vez se ha establecido el contacto con los axones, los oligodendrocitos maduran y generan vainas de mielina funcionales, aunque estructuralmente diferentes a las que se forman en el período neonatal.

Durante el desarrollo embrionario las CPOs, que expresan en su superficie el proteoglicano NG2, se originan y migran desde la zona subventricular de los ventrículos laterales embrionarios (SVZ) al parénquima prosencefálico (Menn et al., 2006). Caudalmente, estos progenitores siguen el fórnix hacia la fimbria y el hipocampo. Por este motivo, la fimbria representa una estructura ideal para explorar los procesos de remielinización por su relación con la SVZ.

En animales adultos, las células progenitoras neurales, con potencialidad para convertirse en CPOs, se generan en la SVZ y en la zona subgranular del giro dentado (Nishiyama et al., 2005; Nishiyama et al., 2009). Además, las CPOs están presentes constitutivamente dispersas en el parénquima del SNC a lo largo de la vida adulta (Menn et al., 2006; Nait-Oumesmar et al., 1999; Nielsen et al., 2006; Nishiyama et al., 2002) y pueden diferenciarse específicamente a astrocitos y oligodendrocitos capaces de remielinizar axones *in vivo* (Kang et al., 2010).

Sin embargo, en las lesiones crónicas de la esclerosis múltiple se producen múltiples disfunciones en los mecanismos de remielinización (Sim et al., 2002) de forma similar a lo que ocurre en el modelo de desmielinización crónico utilizado en este estudio mediante el uso de cuprizona (Armstrong et al., 2006).

En estos casos se puede observar tres tipos de alteraciones que impiden el proceso de remielinización fisiológico y que actúan conjuntamente al proceso selectivo de destrucción de CPOs locales debido al ambiente degenerativo de la lesión (Chari, 2007):

- 1) Ausencia de CPOs debido a una disfunción en su capacidad de división y/o reclutamiento en el lugar de la lesión.
- 2) Las CPOs que están presentes son células quiescentes incapaces de responder a las señales y diferenciarse a oligodendrocitos funcionales.
- 3) Destrucción de CPOs locales debido al ambiente citotóxico presente en la placa de desmielinización.

Estos procesos son consecuencia de la carencia de factores tróficos en la lesión desmielinizada impidiendo la puesta en marcha de los mecanismos necesarios para activar la remielinización fisiológica.

En condiciones normales, los precursores tempranos de las CPOs se encuentran en las áreas neurogénicas del cerebro y se activan cuando ocurre una desmielinización patológica cercana (Nait-Oumesmar et al., 1999). De modo similar, en el presente trabajo, al realizar una lesión desmielinizante crónica en el grupo Control, observamos un incremento en el número de progenitores tempranos en la SVZ. Sin embargo, estos progenitores son incapaces de abandonar este nicho neurogénico para migrar y reparar las zonas desmielinizadas debido a la carencia de factores en la lesión crónica que estimulen este proceso, por falta de señales apropiadas o por agotamiento de progenitores.

Se han caracterizado diversos factores de crecimiento que pueden incrementar el proceso de reparación neural y remielinización, entre ellos:

- PDGF actúa como un potente mitógeno para las CPOs, pues estas células expresan PDGF α R (McKinnon et al., 1993; Nishiyama et al., 1996a; Nishiyama et al., 1996b).
- La familia de FGFs promueven proliferación celular a la vez que suprimen diferenciación a células maduras de CPOs (McKinnon et al., 1990; McKinnon et al., 1991).
- NT3 incrementa la supervivencia de oligodendrocitos maduros (Barres et al., 1994).
- IGF-1 actúa como mitógeno de CPOs (Ye & D'Ercole, 1999), incrementa la supervivencia tanto de CPOs como de oligodendrocitos maduros (Barres et al., 1993) y además es el único factor oligodendrogénico conocido capaz de diferenciar células madre neurales adultas a oligodendrocitos (Rivera et al., 2010).

Además, ciertas combinaciones de factores de crecimiento trabajan sinérgicamente en reparación y remielinización. Por ejemplo, FGF2 conjuntamente a IGF-1 induce a las CPOs entrar en ciclo celular (Jiang et al., 2001), mientras que FGF2 junto a PDGF convierte CPOs adultas con bajo índice mitótico, a progenitores con alto índice mitótico característicos de las CPOs del período perinatal (Wolswijk & Noble, 1992).

En otros estudios, al inyectar intratecalmente un coctel de factores de crecimiento formado por PDGF, FGF- β , NT3 e IGF-1, se incrementa la proliferación, supervivencia y diferenciación de CPOs, y por tanto aumenta la remielinización (Kumar et al., 2007). Sin embargo estos últimos resultados fueron descritos en un modelo de desmielinización aguda usando cortos períodos de tratamiento con cuprizona, por lo que se debe considerar la posibilidad de que parte de la

remielinización observada se deba a la propia capacidad regenerativa de los progenitores endógenos al cesar el estímulo lesivo.

Por tanto, encontrar la combinación de moléculas capaces de estimular las CPOs quiescentes o sus progenitores tempranos, así como de inducir la migración hacia la zona lesionada y su diferenciación a oligodendrocitos capaces de reconocer, contactar e interactuar con axones desmielinizados y generar una vaina de mielina funcional, se ha convertido en un objetivo para poder regular terapéuticamente el proceso de regeneración de mielina.

Sin embargo, existen ciertos inconvenientes en el uso de factores tróficos como posible tratamiento frente a la desmielinización. Uno de ellos es encontrar la dosis adecuada en la que estas moléculas ejercen su efecto terapéutico, pues una dosis insuficiente puede no tener efecto alguno en la remielinización, mientras que un exceso de dosis puede provocar lesiones celulares. Po ejemplo, un exceso de infusión de BDNF tras axotomía en ratas inhibe la regeneración axonal de las motoneuronas (Boyd & Gordon, 2002).

Se debe estudiar la forma más eficiente de administración de la terapia: la vía oral no suele ser efectiva, pues la mayoría de factores tróficos son proteínas cuya estructura molecular se altera en el pH gástrico, a la par que su absorción como macromoléculas se ve impedido por la propia naturaleza de los transportadores entéricos. Además, aunque la administración se realizase intravenosa o intramuscular, lo cual preservaría la estructura macromolecular y permitiría una biodisponibilidad del 100%, la barrera hematoencefálica impediría el paso de dichos factores al interior del parénquima del SNC donde se encuentran sus dianas terapéuticas. Por otro lado, la administración intratecal directa de factores tróficos, o mediante el uso de bombas de infusión, puede producir efectos adversos que superen al beneficio obtenidos mediante esta técnica.

Por ejemplo, la infusión de NGF β en pacientes con enfermedad de Alzheimer, disminuye ligeramente el deterioro cognitivo, pero incrementa los episodios de dolor a niveles que impide mantener una buena calidad de vida y que únicamente ceden tras la interrupción del tratamiento (Eriksdotter-Jonhagen et al., 1998). Otro ejemplo de lo anteriormente descrito constituye la infusión intraventricular de GDNF en pacientes con Parkinson, que apenas mostró efectos beneficiosos y sí gran cantidad de efectos adversos (Nutt et al., 2003).

Estos datos revelan la importancia de encontrar el protocolo temporal adecuado de liberación de factores tróficos (continuo vs intermitente), su proximidad al tejido diana y la concentración fisiológica a la que debe actuar.

2.2.- SOBRE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.

El planteamiento sobre el trasplante de MSCs intravenoso, intratecal o intraparenquimal en varios modelos experimentales animales, incluidos los neurodegenerativos, así como en múltiples ensayos clínicos, se justifica por el hecho que estas células:

A) Secretan una gran variedad de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Caplan & Dennis, 2006; Jones et al., 2010; Pastor et al., 2011; Pastor et al., 2013) que se liberan y actúan de forma autocrina y paracrina en respuesta al nicho donde se han ubicado.

B) Presentan fenómenos de fusión celular. En publicaciones previas de nuestro grupo de investigación, se describe como las MSCs son capaces de rescatar neuronas de Purkinje mediante procesos de fusión celular en un modelo de ataxia cerebelosa (Jones et al., 2010).

C) Tienen la capacidad de modular la respuesta inmunológica y suprimir la respuesta inflamatoria, mecanismos implicados en la patogenia de la desmielinización en la EM. Este efecto se realiza a través de la inhibición y regulación de la proliferación de linfocitos T (Uccelli et al., 2006), constituyendo por tanto, un beneficio adicional en el tratamiento de esta patología.

Algunos de los factores liberados por las MSCs promueven la diferenciación de células progenitoras neurales (CPNs) a oligodendrocitos estableciendo un nicho oligodendrogénico por medio de la liberación de factores tróficos solubles capaces de interactuar con las CPNs (Rivera et al., 2009). Entre estos factores se encuentran factores de crecimiento (FGF2, VEGF e IGF-1), citocinas (TGF- β 1 y CNTF) y factores neurotróficos (NT3, BDNF y NGF) (Rivera et al., 2006).

En línea con los trabajos descritos anteriormente, hemos corroborado que las MSC expresan en cultivo FGF2, IGF-1, NT3, BDNF y NGF- β , además de otros factores implicados en remielinización como PDGF, NT4/5, GDNF y EGF. Sin embargo, hemos observado que la expresión de BDNF y GDNF se pierde antes del día 90 post-trasplante. Por el contrario, algunos autores describen que las MSCs humanas no sintetizan NT3 (Schinköthe et al., 2008) por lo que, si este factor es clave en el proceso oligodendrogénico, se debe extrapolar con cautela los mecanismos implicados en remielinización obtenidos en modelos animales a los observados en los ensayos clínicos.

2.3.- SOBRE LA MIGRACIÓN DE CPOs.

En este trabajo se describe como el trasplante de MSCs constituye una fuente de citocinas y factores tróficos que generan un nicho en el SNC es capaz de promover la proliferación, migración y diferenciación de CPOs. Estos factores son liberados al medio extracelular durante un período de tiempo suficiente para activar tanto a CPOs locales en el parénquima nervioso,

como a progenitores más lejanos en la SVZ y la ZSG del GD del hipocampo, activar los mecanismos celulares que capacitan la migración, atraerlos y repoblar la lesión desmielinizada para posteriormente diferenciarse a oligodendrocitos funcionales.

Por este motivo, el trasplante actúa a modo de “micro-bomba” de factores tróficos cuya viabilidad y funcionalidad a lo largo del tiempo es mayor que cualquier preparado farmacológico de liberación lenta.

Como parte de los resultados de este estudio hemos señalado que, ante una lesión desmielinizante crónica y sin capacidad de remielinización espontánea, los progenitores localizados en la SVZ son capaces de proliferar y aumentar en número como respuesta a la lesión. Sin embargo, éstos son incapaces de movilizarse desde los nichos neurogénicos de origen hacia las zonas lesionadas, equiparándose a lo que ocurre en las lesiones crónicas de la esclerosis múltiple (Williams et al., 2007). Este suceso igualmente sucede en el grupo Operado Sham donde se comprueba que el cambio en el microambiente tisular generado por el trauma quirúrgico no es capaz de activar la atracción de los progenitores.

Al contrario de lo observado en los controles, al trasplantar MSCs se liberan los factores del secretoma mesenquimal que son necesarios para promover la movilización y reclutamiento de progenitores de forma selectiva hacia la fuente de factores tróficos, lo que implica un descenso de la densidad celular en el nicho neurogénico.

Este descenso en la densidad celular está acorde con un proceso de movilización celular y es mayor cuanto más próximo se encuentra el nicho neurogénico del trasplante donde se ubica la fuente de factores tróficos y donde su concentración es mayor, siendo por tanto, su influencia también mayor. Específicamente, en línea con lo que describen otros autores, EGF, uno de los factores sintetizados por las MSCs, promueve la proliferación y migración de progenitores de la SVZ hacia el estriado, septum, cuerpo calloso y la fimbria-fornix (Cantarella et al., 2008; González-Pérez et al., 2009).

Las CPOs movilizadas desde estos nichos neurogénicos se encuentran transcripcionalmente y funcionalmente activas, pues expresan intensamente el factor de transcripción c-fos y el proteoglicano NG2 en su membrana. Además, el proceso migratorio de estas células ocurre de forma ordenada hacia la fuente de factores, pudiéndose localizar un cordón celular que discurre de regiones rostro-laterales hacia caudo-mediales del epéndimo dorsal del ventrículo telencefálico homolateral al trasplante.

A este cordón migratorio de CPOs le hemos denominado “corriente migratoria caudal” y prosigue hasta rodear el trasplante de MSCs sin abandonar el subepéndimo (Figura D1).

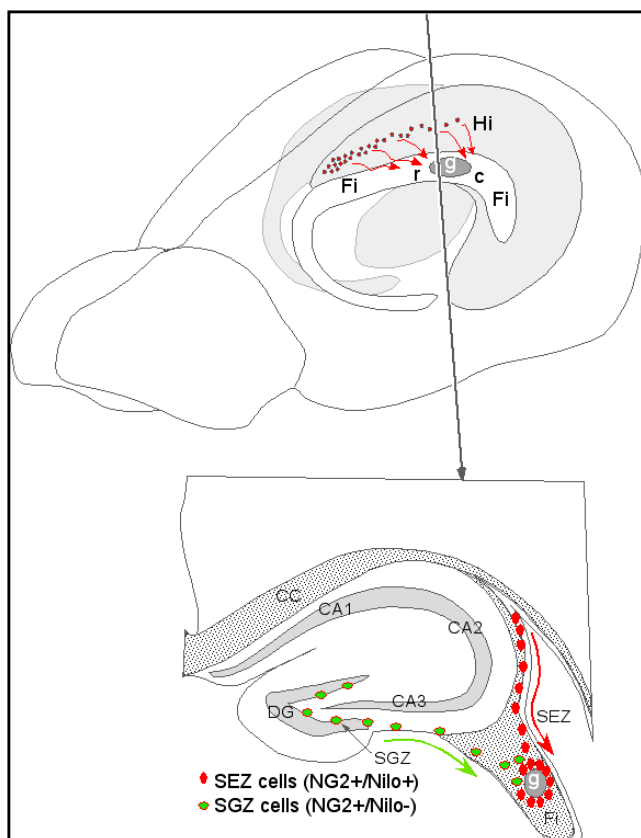


Figura D1: Corriente migratoria caudal.

Representación esquemática de la remielinización inducida por el trasplante de células madre mesenquimales. Arriba se indica el lugar de inyección de las MSCs (g) en la fimbria (Fi), donde ejercerían un efecto activador y quimiotáctico sobre las CPO generadas en la zona subependimaria (SEZ) y el giro dentado (DG) del hipocampo (Hi).

En la imagen inferior se muestra un esquema del proceso de remielinización en una sección a nivel del trasplante donde se representa la migración de CPOs NG2+ desde dos nichos neurogénicos: la zona subependimaria (SEZ) de donde provienen la mayoría de ellos que se caracterizan por ser Nilo1+ (en rojo); y la zona subgranular (SGZ) del DG (en verde).

CC: cuerpo caloso; CA1, 2 y 3: asta de Amón áreas 1, 2 y 3. R y C indica rostral y caudal al trasplante respectivamente.

Durante este camino migratorio las CPOs expresan:

- 1) El receptor p-ERK, implicado en el mecanismo de señalización intracelular de la activación de receptores de factores tróficos para promover proliferación, supervivencia y/o movilidad en oligodendrocitos (Chandran et al., 2003; Furusho et al., 2011; Mitew et al., 2014). Además, las células periféricas al trasplante expresan intensamente el receptor de crecimiento nervioso de baja afinidad p75-NTFR que actúa como modulador positivo frente a la unión de factores de crecimiento implicados en remielinización a sus receptores de alta afinidad (Cosgaya et al., 2002; Ng et al., 2007).
- 2) Nilo-1, un marcador de progenitores neurales que vincula la procedencia de las CPOs a la diferenciación de los progenitores de la SVZ (Del Valle et al., 2010).

Histológicamente también se han detectado CPOs procedentes del giro dentado del hipocampo que igualmente migran por la zona subependimaria de la fimbria trasplantada y se incorporan en el interior del parénquima nervioso donde emiten varios procesos citoplasmáticos capaces de envolver axones cercanos.

En otros trabajos se ha demostrado que los progenitores de la SVZ se diferencian preferentemente a oligodendrocitos tempranos Olig2+, son capaces de migrar hasta 3 mm a

través del parénquima nervioso y expresar MBP en tan solo siete días después de ser trasplantados en el cerebro. Además, se describe que la síntesis de MBP se incrementa progresivamente durante tres semanas más para luego mantenerse estable a lo largo del tiempo (Mothe & Tator, 2008; Mothe et al., 2008; Sellers et al., 2009).

En concordancia con estos trabajos, en nuestros resultados se observa que 90 días después de haber realizado el trasplante, las MSCs han activado los mecanismos que permiten la atracción y diferenciación de CPOs en la periferia del trasplante, incrementándose igualmente la tasa de transcripción de factores involucrados en el programa de diferenciación de las CPNs a oligodendrocitos maduros, e incluso sintetizar y organizar los componentes moleculares de la mielina para formar vainas funcionales bajo parámetros estructurales y electrofisiológicos.

En el grupo Operado Sham se observa un ligero incremento de CPOs alrededor del lugar de inyección de solución vehículo. En estudios previos se describe como las CPOs NG2+ incrementan su tasa de proliferación ante fenómenos isquémicos, desmielinización o algún otro tipo de lesión en el SNC (Levine et al., 2001; Levine, 2016). Sin embargo, estas CPOs no son capaces de diferenciarse a oligodendrocitos maduros ni formar mielina, hecho que se evidencia por la ausencia de MBP en el lugar donde se concentran las CPOs en el lugar de la inyección, pues este grupo carece del secretoma propio del trasplante de MSCs necesario para que suceda la maduración oligodendroglial. Además, el origen de éstas CPOs no serían los nichos neurogénicos descritos anteriormente, sino el parénquima nervioso adyacente a la lesión, ya que en este grupo las CPOs carecen del marcador Nilo1. Pese a esto, los nichos neurogénicos están activos y presentan un incremento de la celularidad como respuesta a las lesiones desmielinizante y quirúrgica, aunque al no haber moléculas que promuevan su movilización, no son capaces de abandonar estos nichos.

En este trabajo observamos que la reacción astrogliar desencadenada en respuesta al proceso quirúrgico no sintetiza y libera los factores necesarios para atraer y diferenciar CPOs, pese a que algunos autores sugieren que los astrocitos sí toman un papel activo en el proceso de la remielinización (Albrecht et al., 2003).

En concordancia con estos resultados, estudios posteriores realizados en el laboratorio, han puesto de manifiesto que el trasplante intraventricular de MSCs incrementa el número de CPOs, oligodendrocitos maduros y el contenido de mielina del cuerpo calloso de ratones crónicamente desmielinizados. De modo congruente al presente trabajo, en el líquido cefalorraquídeo de los ratones trasplantados existe un incremento de PDGF, IGF, NT3, NT4 y FGF2 a la vez que un incremento en la celularidad de la SVZ (Cruz-Martínez et al., 2016).

3.- RECUPERACIÓN FUNCIONAL DE LA ZONA DESMIELINIZADA TRAS EL TRASPLANTE DE MSCs.

La remielinización es el fenómeno por el cual se generan nuevas vainas de mielina alrededor de los axones del SNC restaurando sus propiedades de conducción y por tanto su función neurológica, además de ejercer un efecto neuroprotector en los axones (Chari, 2007).

En la EM, los oligodendrocitos que sobreviven a una lesión de desmielinización y que han perdido los procesos que forman las vainas de mielina, no contribuyen a una posterior remielinización pues, pese a que son capaces de formar nuevas capas de mielina compacta, no la pueden situar correctamente alrededor de axones desmielinizados para formar nuevas envolturas funcionales (Franklin, 2002). Por este motivo, aunque hemos observado una activación y maduración de CPOs a células formadoras de mielina en zonas de haces axonales crónicamente desmielinizados, así como la formación de vainas de mielina, es necesario realizar pruebas funcionales electrofisiológicas para confirmar que el proceso de remielinización observado es funcional y recupera la correcta transmisión del impulso nervioso.

Según describen otros autores, los axones remielinizados tras haber perdido su envoltura ante un proceso patológico, el valor de G-ratio (razón entre el radio axonal y el radio axón + envoltura de mielina) es mayor que en los axones cuya mielinización se ha producido de forma habitual durante el período neonatal. Esto significa que la envoltura de la capa de mielina en un axón remielinado en el período adulto es menor a lo que correspondería para el diámetro del axonal que envuelve. Además, la longitud internodal es más corta, por lo que no se mantiene la relación entre ésta y el diámetro del axón (Murray & Blakemore, 1980). Estas diferencias son muy marcadas en los largos y gruesos axones que componen la vía piramidal, pero no lo son tanto en los axones de diámetro pequeño como los que forman el cuerpo calloso, donde el G-ratio de los axones remielinizados en edad adulta es indistinguible a los valores de la mielinización neonatal (Franklin & Ffrench-Constant, 2008). Pese a esto, la remielinización permite a los axones recuperar, en parte, las propiedades de conducción, inclusive la normalización del período de latencia (Smith and Schauf, 1979; Smith et al., 1979; Smith et al., 1981) pues se estimula el desarrollo y maduración de nuevos nodos axonales y se produce una distribución normal de los canales iónicos operados por voltaje dentro de los nodos (Sasaki et al., 2006).

La pérdida de la óptima funcionalidad axonal secundaria a la pérdida crónica de la vaina de mielina se ve compensada por el incremento compensatorio en el número de canales de Na^+ operados por voltaje. Aun así, dentro del segmento lesionado del axón se pierde la conducción saltatoria del potencial de acción y éste se torna ineficiente. Además, el incremento del número de los canales de Na^+ operado por voltaje en la membrana del axón desmielinizado provoca un aumento sustancial del flujo de sodio hacia el interior del axón para poder conducir el impulso nervioso y en consecuencia, se produce una despolarización de la membrana axonal

sustancialmente superior a la fisiológica, que aumenta el período refractario ante un nuevo estímulo. Por este motivo, el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ revierte su funcionamiento, exportando Na^+ al medio extracelular e importando Ca^{2+} al interior del axón, cuyo exceso incrementa los niveles de la enzima glutaminasa que, a su vez, incrementa los niveles de glutamato, un neurotransmisor que en exceso es tóxico para la neurona. Además, estos axones distróficos liberan el glutamato al espacio extracelular, atrayendo macrófagos y células de la microglía que agravan el proceso (Aktas et al., 2010).

Por este motivo, la restauración de la distribución internodal de los canales de sodio que se consigue mediante el proceso de remielinización, promueve la protección de la integridad axonal y en consecuencia incrementa la supervivencia de la neurona. Además, las CPOs y los oligodendrocitos maduros también promueven la supervivencia neuronal mediante la liberación de factores solubles y el establecimiento de uniones celulares específicas con el axón. Ambos procesos, junto a los anteriores, son el motivo por el que la remielinización previene la atrofia axonal (Wilkins et al., 2001; Wilkins et al., 2003).

En este trabajo hemos cuantificado la velocidad de conducción de los axones de la fimbria que discurren en la periferia del trasplante. En condiciones normales, pueden detectarse electrofisiológicamente dos tipos de fibras en la fimbria: fibras rápidas y lentas cuyas velocidades se atribuyen histológicamente a axones gruesos con una capa de mielina gruesa y a axones más delgados con ausencia o escasa capa de mielina respectivamente.

Después del tratamiento desmielinizante con cuprizona, la vaina de mielina efectivamente se ve afectada, como se constata inmunohistológicamente en el grupo Control, objetivando la pérdida de proteínas esenciales para el mantenimiento de su estructura como MBP y PLP. Sin embargo, la velocidad de conducción paradójicamente apenas muestra variaciones significativas respecto a los valores normales. Este suceso se debe a mecanismos fisiológicos compensatorios como son la redistribución de canales de Na^+ OPV a lo largo del axón afectado o al incremento del diámetro axonal secundario a dilataciones axonales que disminuyen la resistencia al flujo iónico (Waxman, 2008a; Waxman, 2008b). Este fenómeno aparece en el grupo Control, donde los axones desmielinizados contienen múltiples dilataciones a lo largo de su recorrido, objetivado por un aumento del diámetro axonal en las secciones histológicas (Chang et al., 2002).

De modo similar, el grupo Operado Sham presenta una velocidad de transmisión del impulso nervioso similar a las observadas en condiciones normales. Sin embargo, en este caso el grosor de la vaina de mielina está seriamente afectado, no solo por el efecto desmielinizante de la cuprizona, sino también por la astrocitosis y la presencia de macrófagos y microglía en la fimbria operada como respuesta al daño inducido por la cirugía. Esta alteración en la homeostasis del axón afecta a su diámetro al perder los mecanismos de regulación osmótica, produciéndose dilataciones a lo largo de su recorrido incluso en mayor medida que en el grupo Control.

En el grupo Trasplantado con MSCs, la velocidad de conducción de las fibras rápidas se duplica respecto a los valores normales y al de los grupos Control y Operado Sham. Además, de modo similar a lo observado en el grupo Control y Operado Sham el diámetro axonal de este grupo es mayor que en condiciones normales.

Hay que tener en cuenta que el grosor de la vaina de mielina es interdependiente del diámetro axonal (Smith et al., 1982). Según esto, si a mayores diámetros axonales les corresponden de modo fisiológico un mayor grosor de mielina, cabe esperar que los axones (o segmentos axonales) de diámetro mayor al normal (en este caso debido a las dilataciones secundarias al tratamiento desmielinizante) a los que posteriormente se ha reactivado el proceso de remielinización, se sintetice y organice a su alrededor una vaina de mielina acorde a éste diámetro. Por tanto, durante el proceso de interacción con el axón, las CPOs organizan una vaina de mielina acorde a este nuevo diámetro, con independencia de ser fisiológico o secundario a un proceso patológico (Figura D2).

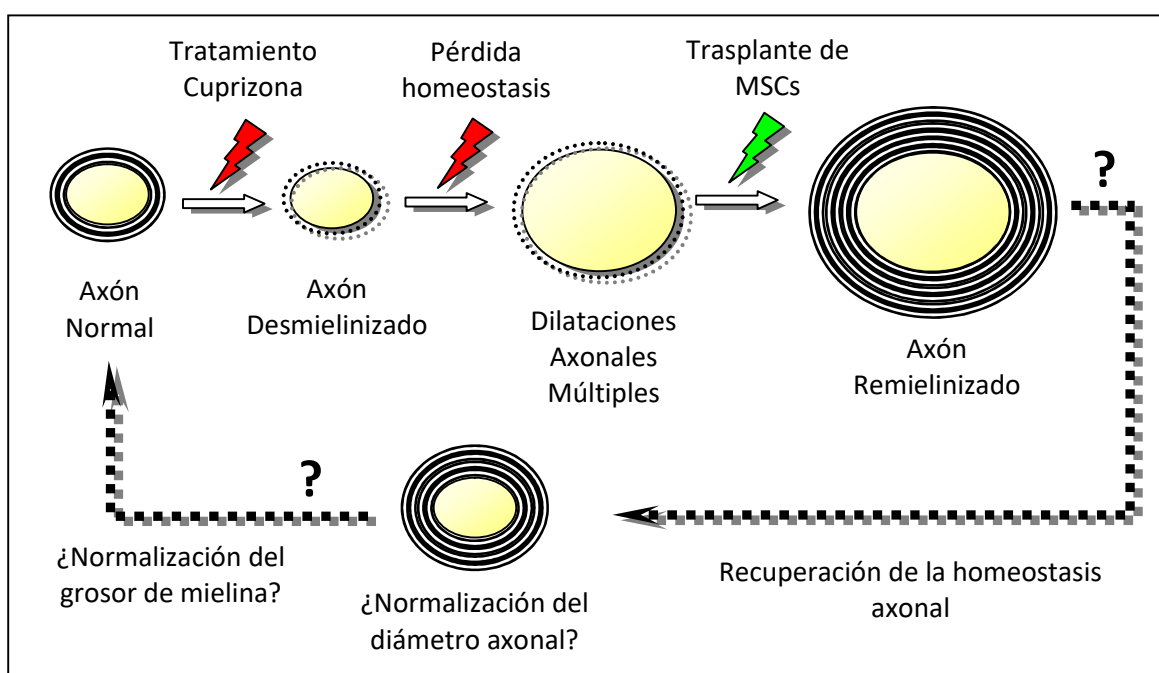


Figura D2: Hipótesis propuesta a cerca de las variaciones en el diámetro del axón y del grosor de la vaina de mielina.

Según el modelo que proponemos, un axón normal que pierde la vaina de mielina ve afectada su homeostasis con aparición de múltiples dilataciones a lo largo de su recorrido. Si se activa la remielinización en este punto, antes de que el axón se vuelva inviable, los oligodendrocitos formarán una vaina de mielina de un grosor mayor al original, proporcional al nuevo diámetro axonal.

Si la remielinización recupera la homeostasis axonal, se propone que el diámetro axonal recupere sus valores normales al tiempo que la vaina de mielina se remodela hasta alcanzar el grosor normal.

Éste modelo explicaría por qué los axones del grupo Operado Sham poseen un diámetro axonal mayor que el grupo Normal. Igualmente también explicaría por qué el grupo Trasplantado con MSCs posee un grosor de mielina mayor al Normal pero con un diámetro axonal menor que el grupo Operado Sham secundario a la normalización de las dilataciones axonales por la recuperación de la homeostasis axonal.

La remielinización sobre un axón dilatado podría ser la causa del incremento en la velocidad de conducción, pues ésta permite a los axones recuperar las propiedades de conducción incluyendo la normalización del período de latencia (Smith et al., 1979; Smith et al., 1981), estimulando el desarrollo y maduración de nuevos nodos axonales y normalizando la distribución iónica normal de los canales dentro de los nodos (Sasaki et al., 2006).

Además, al realizar los registros en la zona rostro-medial de la fimbria trasplantada, más cercana a la SVZ y giro dentado del hipocampo, se observa un incremento en la velocidad de conducción todavía mayor, posiblemente por su cercanía a las rutas migratorias de CPOs procedentes de los nichos neurogénicos. Acorde a estos resultados, en esta área se observa un mayor número de CPOs NG2+ y vainas de mielina más compactas con mayor inmunoreactividad para MBP.

En concordancia con estos resultados, en estudios posteriores realizados en nuestro laboratorio, igualmente se objetiva que el trasplante intraventricular de MSCs, incrementa la velocidad de conducción axonal de los axones del cuerpo calloso, a la par que incrementa el grosor de la vaina de mielina y disminuye el g-ratio axonal (Cruz-Martínez et al., 2016).

4.- FGF8 Y SU IMPLICACIÓN EN LA CAPACIDAD REMIELINIZANTE DE LAS MSCs.

Al igual que los otros miembros de la familia de FGFs, el FGF8 es un factor morfogenético implicado en el desarrollo de vertebrados (Mason et al., 2000), estimulando dos procesos clave en el desarrollo:

- 1) Proliferación celular: FGF8 estimula la proliferación celular en mesencéfalo, romboencéfalo (Crossley et al., 1996; Lee et al., 1997; Xu et al., 2000) y prosoencéfalo (Storm et al., 2006). En estudios propios de nuestro laboratorio se ha demostrado que ratones heterocigotos con una copia de FGF8 no funcionante, reducen la tasa de proliferación de progenitores neurales aunque no se incrementa la degeneración de estos progenitores. Además, si posteriormente se inyectan células que expresan constitutivamente FGF8 en el SNC de estos embriones heterocigotos, se rescata la tasa de proliferación original de los progenitores neurales (Martínez-Ferre & Martínez, 2009).
- 2) Migración celular: FGF8 tiene un papel importante en el proceso de migración de progenitores, pues si se introduce una fuente de FGF8 exógeno en el SNC embrionario, se estimula la migración radial desde la zona subventricular hacia la placa cortical (Smith et al., 2006).

- 3) Maduración neuronal en el tálamo: a través de la glía radial, la señal de FGF8 es transportada a regiones de la capa del manto, donde controla la diferenciación y supervivencia de las neuronas de los núcleos sensoriales (ventro-laterales) del tálamo (Botella-Lopez et al. 2019).

Sin embargo, pese a estas funciones clave en el desarrollo, se conoce muy poco sobre el papel que desempeña este factor en patologías del SNC adulto, particularmente en las patologías en las que se ve afectada la mielina. Aunque FGF8 presenta una estructura similar a la de FGF2, las CPOs expresan más MBP en presencia de FGF8 que de FGF2 (Fortin et al., 2005), sugiriendo que ambos factores no deben ser considerados como similares, pues presentan efectos cuantitativamente distintos.

En nuestro grupo de investigación hemos demostrado que FGF8 es capaz de inducir migración y atracción de CPOs en cultivo hacia una fuente de FGF8 estática mediada por las vías de señalización dependientes de los receptores de FGF, pues si éstos son inhibidos selectivamente, se pierde esta capacidad de atracción. Por otro lado, también hemos demostrado que FGF8 incrementa la proliferación de CPOs y no entorpece su diferenciación a oligodendrocitos maduros, lo cual resultaría en un mayor número de estas células cerca de la fuente de FGF8 (Cruz-Martínez et al., 2014).

En el presente trabajo describimos como las MSCs en cultivo son capaces de sintetizar y mantener en su citoplasma la proteína FGF8. Sin embargo, debido a posibles mecanismos de autorregulación, la transcripción de su mensajero se encuentra reprimida por la sobreexpresión de Sprouty-2 en el momento previo al trasplante y se mantiene al menos 90 días después de realizar los trasplantes intraparenquimales de MSCs.

Pese a la ausencia de expresión génica, la proteína FGF8 almacenada en el citoplasma de las MSCs se libera en el parénquima nervioso, generando un acusado gradiente de concentración de FGF8 que se extiende por la fimbria trasplantada y zonas adyacentes. Las áreas con mayor concentración de FGF8 se corresponden a las que se encuentra un mayor número de CPOs y mayor remielinización de axones.

Trasplantando bolas de heparina embebidas con FGF8 se estimula el reclutamiento de CPOs de forma similar, aunque en menor cantidad, a un trasplante de MSCs. Se establecen contactos entre las CPOs y las bolas embebidas con FGF8, mientras que si las bolas trasplantadas están embebidas con PBS, no suceden estos contactos. Además, el FGF8 liberado por las bolas de heparina activa la sobreexpresión de NG2 en las CPOs propias del córtex cerebral.

Sin embargo, la reacción astrogliol secundaria al trasplante de bolas de heparina, es mucho mayor que la observada en el trasplante de MSCs debido al carácter inmunomodulador que

presentan estas últimas. La astrocitosis se caracteriza por la presencia de una densa matriz de procesos citoplasmáticos de astrocitos que en conjunto forman la cicatriz glial. Esta cicatriz previene el daño primario en los axones ante un ambiente lesivo, como el que se genera tras el proceso quirúrgico, pero a su vez, ésta densa maraña astrocitaria inhibe físicamente el proceso de remielinización, pues restringe el acceso de los oligodendrocitos a los axones (Groves et al., 1993), pudiendo ser éste el motivo por el que la remielinización conseguida con las bolas de FGF8, pese a ser mayor que en el grupo Operado Sham, es inferior al obtenido con el trasplante de MSCs.

5.- POTENCIALIDAD REMIELINIZANTE DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES DEL LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO Y DE LA PULPA DENTAL HUMANA.

Al igual que han observado otros autores, tanto las células de la pulpa dental como las del ligamento periodontal, se integran y sobreviven en el SNC, sin embargo, poseen una elevada tasa de mortalidad tras ser trasplantadas (Huang et al., 2008). Esto puede deberse a que, pese a que los ratones trasplantados se encuentran parcialmente inmunodeprimidos, a medida que el ratón envejece puede recuperar parte de su sistema inmunológico, pudiendo ser ésta la causa de la alta tasa de mortalidad encontrada frente al trasplante xenogénico realizado en este estudio.

Pese a esto, las células de la pulpa y ligamento periodontal que permanecen viables presentan una elevada actividad migratoria a través de una matriz extracelular de N-CAM. Éstas se asocian a esta matriz extracelular mediante extensiones citoplasmáticas que les confiere una polarización paralela a la dirección de migración y que siempre sucede hacia estratos ventrales del parénquima. En algunos casos se puede observar como las células trasplantadas invaden las meninges ventrales y toman contacto con el periostio de la fosa cerebral media.

Este proceso de migración observado puede explicarse por la naturaleza ecto-mesenquimal propia de éstas células. Su origen proviene de la cresta neural embrionaria desde donde migran para situarse en estratos inferiores dentro del proceso mandibular y maxilar embrionario donde induce a células de la estirpe ectodérmica del estomodeo para la formación del diente. De dicha interacción se induce la diferenciación a los distintos tipos celulares que formarán las capas del diente (Chai et al., 2000).

En estudios previos en nuestro laboratorio se describe como estas células expresan marcadores de estirpe neural (Bueno et al., 2013), aunque para ello es necesario inducir las previamente *in vitro* en medio neurogénico, lo que dificulta su estandarización en su uso en terapia clínica. En línea con estos resultados, en la presente tesis doctoral hemos descrito que las células de la pulpa dental expresan marcadores oligodendrogliales (O4) aunque no se observa un incremento

en la remielinización de los axones circundantes. Esto significa que, pese a que las células de la pulpa dental expresan el marcador de oligodendrocitos O4, no son células funcionales en cuanto a remielinización se refiere.

Por otro lado, si se trasplantan células del ligamento periodontal en SNC una vez han sido cultivadas en medio de inducción neural, adquieren morfología bipolar típica de células madre neurales, se integran en nichos neurogénicos como la zona subgranular del giro dentado del hipocampo y emiten procesos tangenciales que se extienden a lo largo de la capa subgranular (Bueno et al., 2013). Sin embargo no se observó ningún proceso de atracción de CPOs al lugar del trasplante como el que observamos en este trabajo al trasplantar las células directamente sin realizar previamente una inducción neural pero, al no incrementar el grado de remielinización, concluimos que no existen las señales adecuadas para que las CPOs maduren a oligodendrocitos capaces de remielinizar la fimbria trasplantada.

Independientemente de estos resultados pobres en cuanto a remielinización se refiere, hemos encontrado varias propiedades en las células del ligamento periodontal humano que las predispone, a falta de contrastar estos resultados inmunohistológicos con otras técnicas de análisis molecular, ser unas buenas candidatas para el estudio de tratamiento celular frente situaciones patológicas en las que el crecimiento axonal se ve limitado, como las lesiones medulares u otras enfermedades donde la integridad de la neurona se ve afectada. Estas propiedades son:

- 1) capacidad neurogénica, pues parte de estas células expresan marcadores de progenitores neurales con expresión de Nestina debido a su origen embrionario de la cresta neural
- 2) capacidad de atracción y permisividad de crecimiento de colaterales axónicos que invaden el complejo celular Nestina/células del ligamento periodontal.
- 3) alta capacidad de migración e integración en tejido nervioso central a través de la molécula de la matriz extracelular N-CAM.
- 4) capacidad de atracción y migración conjunta con CPOs, que las acompañan en su camino migratorio en los que está implicado el proteoglicano.

Estas propiedades que se describen son las que se buscan en las células utilizadas en terapias experimentales frente las lesiones medulares, pues los axones seccionados en esta patología no pueden invadir la cicatriz glial formada a consecuencia de la lesión (Schwab et al., 1993).

Por estos motivos, el estudio de las células madre de ligamento periodontal humano, aunque *a priori* no tienen las características más adecuadas para realizar una posible terapia frente enfermedades desmielinizantes, puede considerarse una posible herramienta experimental para tratar lesiones axonales del sistema nervioso central promoviendo y guiando el crecimiento

axonal a sus dianas (Arthur et al., 2009), además, también incrementan la migración, proliferación y supervivencia de células neurales endógenas (Huang et al., 2008).

6.- POTENCIAL REMIELINIZANTE DE OLIGODENDROCITOS INMORTALIZADOS. LÍNEA 158N.

Los oligodendrocitos inmortalizados de la línea 158N trasplantados en fimbrias crónicamente desmielinizadas, mantienen las características inmunohistoquímicas básicas de células oligodendrogiales maduras como O4, MBP y PLP. Un pequeño porcentaje de estas células expresan marcadores de oligodendrocitos inmaduros como Olig2 y Ca-II. Ninguna de ellas expresa el marcador característico de células de Schwann S100 confirmando que las características de las células trasplantadas son propias del sistema nervioso central y no del sistema nervioso periférico.

Sin embargo, una vez se trasplantan en SNC desmielinizado, estas células expresan *de novo* dos marcadores que anteriormente no había sido descritos, quizás debido a una reversión a células de un linaje más inmaduro del que inicialmente fue caracterizado:

- 1) GFAP, marcador típico de células del linaje astrogial, de la glía envolvente olfatoria y de precursores neurales tipo B generados en la zona subventricular.
- 2) β -tubulina neural de la clase III Tuj1, marcador propio del citoesqueleto de axones neurales y de neuroblastos.

Al igual que el trasplante de MSCs, de la pulpa y del ligamento periodontal, las células N158 trasplantadas se rodean por CPOs que provienen de nichos neurogénicos o de precursores locales del parénquima nervioso trasplantado, que han sido reactivados o estimulados tras realizar el trasplante.

Sin embargo al observar las dos posibles zonas neurogénicas cercanas a la fimbria trasplantada (zona subventricular y capa subgranular del giro dentado del hipocampo) encontramos que, a diferencia de lo observado con un trasplante de MSCs, sólo el hipocampo aparece hiper-reactivo frente inmunomarcaje NG2. Las CPOs marcadas presentan finas prolongaciones que cruzan los estratos del hipocampo y que se orientan paralelamente a la fimbria.

Adicionalmente, las células 158N expresan la molécula semaforina 3F. Esta molécula está implicada en procesos de migración y diferenciación de precursores oligodendrogiales y en procesos de guía axonal, propiedades que pueden ser de interés frente al tratamiento patologías de lesión axonal.

Se ha descrito que los oligodendrocitos maduros no manipulados genéticamente trasplantados en el SNC tienen una escasa supervivencia y prácticamente nula capacidad de migración que los hace escasamente eficientes en su uso como terapia celular (Blakemore & Franklin, 1991; Franklin & Blakemore, 1997). En este sentido, los oligodendrocitos inmortalizadas 158N presentan la ventaja de proporcionar células con alta capacidad de supervivencia tras 90 días del trasplante sin incrementar su tasa de proliferación celular (Feutz et al., 2001)

En cuanto a remielinización se refiere, las células 158N son capaces de producir proteínas de mielina incrementando la síntesis de éstas proteínas tanto en la zona trasplantada como su periferia. Sin embargo, es necesario estudiar si este proceso se traduce en una recuperación fisiológica en la transmisión del impulso nervioso, pues al tratarse de una línea celular madura, la efectividad para remielinizar axones desprovistos de mielina es escasa. En este sentido las CPOs son más efectivas en la síntesis de vainas de mielina funcionales (Rivera et al., 2009).

Junto a este hecho hay que destacar la actividad angiogénica que presenta el trasplante, característica también presente en masas celulares tumorales, por lo que pese a tener un ciclo celular similar al de las células gliales en el SNC (Feutz et al., 2001), habría que estudiar cómo evoluciona éste trasplante a largo plazo, su posibilidad de metastatizar, y si ambos procesos se revierten al optimizar a la baja el número de células trasplantadas. Por estos motivos, conjuntamente con el proceso de manipulación génica que han recibido, en principio son células no aptas para su uso clínico.

7.- COMENTARIOS ADICIONALES.

7.1.- RESPECTO AL USO DE MSCs FRENTE OTROS TIPOS CELULARES.

En este estudio hemos utilizado varios tipos celulares para tratar lesiones desmielinizantes crónicas. Tanto las células mesenquimales, células del ligamento periodontal, células de la pulpa dental y oligodendrocitos inmortalizados 158N, poseen propiedades regenerativas que han impulsado varias líneas de investigación para tratar enfermedades degenerativas del sistema nervioso. Sin embargo, hemos profundizado en el estudio de las propiedades de las MSCs por ser éstas las que ofrecen una posible ventaja terapéutica frente enfermedades desmielinizantes crónicas.

Estas ventajas consisten en propiedades diferenciales del trasplante de MSCs:

- 1) Ausencia de actividad proliferativa en el interior del parénquima nervioso, por lo que se descarta su transformación neoplásica. Por contra, las células 158N tienen una tasa de

proliferación mayor hasta el punto de invadir y alterar la estructura fisiológica de la fimbria trasplantada e incluso invadir estructuras vecinas.

- 2) Escasa actividad migratoria por el parénquima nervioso. Se han observado MSCs en otras localizaciones ventriculares distintas al trasplante, pero son células que refluyeron durante el proceso quirúrgico y fueron arrastradas por el propio flujo del líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, las células de la pulpa y el ligamento periodontal siempre migran intraparenquimalmente a estratos inferiores de donde se ha realizado el trasplante, no pudiendo controlar, ante el hipotético uso terapéutico de estas células, la localización final donde se va a ubicar el trasplante.
- 3) Escasa actividad angiogénica, por lo que se minimiza cualquier efecto sistémico por el paso de células o subproductos del trasplante a la circulación sistémica. Esta propiedad también la poseen las células de la pulpa y ligamento periodontal, pero no las células 158N de elevada actividad angiogénica.
- 4) Viabilidad de las células trasplantadas durante meses, permitiendo que el efecto terapéutico que éstas poseen actúe durante el tiempo suficiente como para activar los mecanismos fisiológicos de formación de vainas mielina sin necesidad de realizar nuevas cirugías para reponer posibles pérdidas celulares. Sin embargo las células de la pulpa y ligamento periodontal poseen una alta degeneración, siendo muy variable predecir número de células que son capaces de sobrevivir largo tiempo.
- 5) No son diana frente a los mecanismos patológicos que acontecen en la esclerosis múltiple. Las células 158N, al tratarse de oligodendrocitos, sí lo son.
- 6) Son consideradas como micro-bombas de factores tróficos que difunden localmente para alcanzar nichos neurogénicos locales, pero no los más alejados, por lo que se obtiene una actividad focalizada al lugar trasplantado, evitando así la alteración de zonas no afectadas por la desmielinización.
- 7) Facilidad de obtención de células del propio paciente, lo que evita el rechazo celular que puede aparecer ante un trasplante de células 158N, o la pérdida de piezas dentales para obtener células de la pulpa y ligamento periodontal.
- 8) Estimulación de la remielinización endógena, activando los mecanismos reparadores propios, por lo que la posible degeneración de las propias células trasplantadas con el paso del tiempo no afectará a la regeneración conseguida por el propio sistema regenerador del huésped. Esto diferencia las MSCs de las células 158N que, aunque son

capaces de sintetizar mielina *per se*, una mayor tasa de degeneración celular en las células trasplantadas puede revertir el efecto terapéutico alcanzado.

- 9) Pese a que los cuatro tipos celulares atraen CPOs a la periferia del trasplante, parece que solo las MSCs liberan los factores tróficos necesarios para que éstos se diferencien a oligodendrocitos maduros con capacidad remielinizante, alcanzando tasas de regeneración de mielina similares a las obtenidas con el trasplante de células 158N con actividad remielinizadora *per se* (Figura D3).

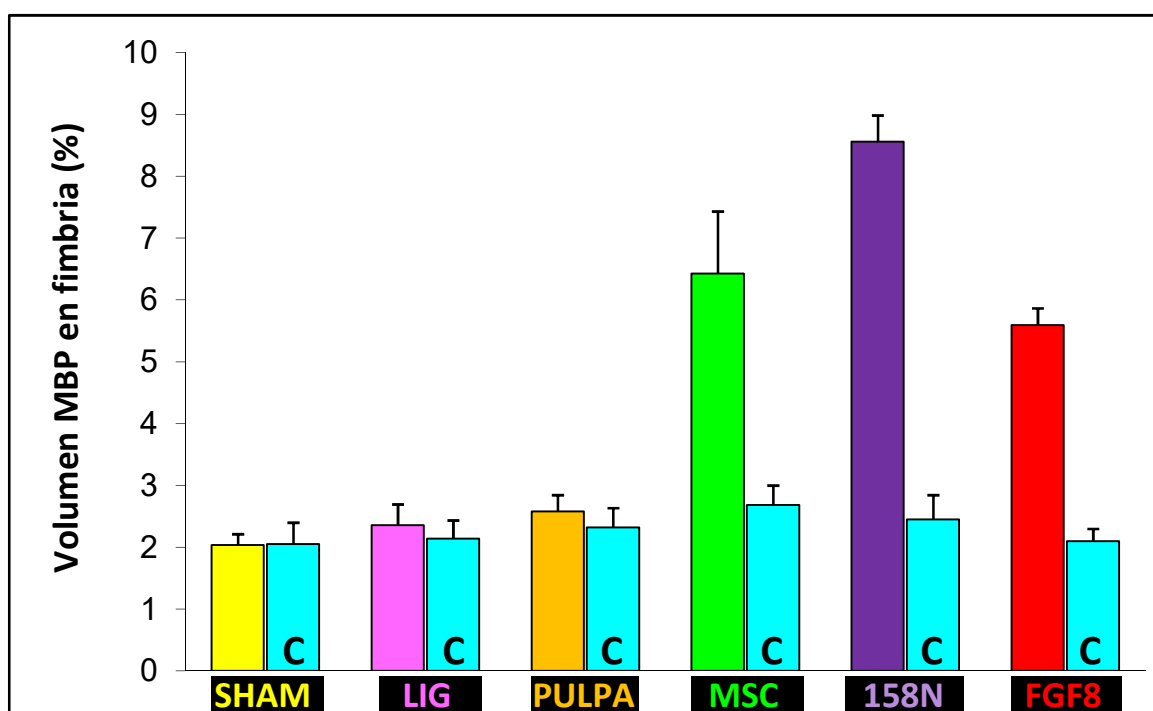


Figura D3: Comparación de la remielinización obtenida mediante el trasplante de las células del ligamento periodontal (barra magenta), de la pulpa dental (barra naranja), de células madre mesenquimales (barra verde) y de oligodendrocitos inmortalizados de la línea 158N (barra morada). Se incluye la remielinización obtenida mediante FGF8 (barra roja).

Únicamente el trasplante de MSCs, de las células 158N y de FGF8 consigue una remielinización significativamente superior a los grupos Control (barras azules) y grupo Operado Sham (barra amarilla).

7.2.- RESPECTO AL TRATAMIENTO CON FGF8.

El presente trabajo introduce al FGF8 en la compleja red molecular del proceso de remielinización donde están involucrados un gran número de moléculas y factores tróficos.

El tratamiento con FGF8 *in vivo* es, por sí mismo, capaz de activar los procesos necesarios para conseguir remielinización axonal. Este hecho es de gran relevancia clínica, ya que otros factores

tróficos aunque pueden activar, inducir diferenciación, migración o supervivencia de oligodendrocitos, necesitan actuar sinérgicamente para observar un efecto terapéutico completo. Por ejemplo, el factor neurotrófico ciliar (CNTF) que es parte del secretoma de las MSCs, promueve la génesis, diferenciación, maduración y supervivencia de oligodendrocitos en el SNC adulto (Talbot et al., 2007; Stankoff et al., 2002), pero por sí solo no es capaz de inducir remielinización en modelos animales (Rivera et al., 2008).

Sin embargo, la administración única de FGF8 parece ser capaz de inducir por sí misma, reclutamiento, activación y maduración de CPOs a partir de la estimulación de los nichos neurogénicos propios del SNC dañado. Estos tres procesos son básicos y necesarios para conseguir una terapia remielinizante efectiva.

La capacidad de FGF8 para activar por sí mismo todo el proceso de remielinización se debe, posiblemente, a que las CPOs poseen en su membrana los cuatro receptores de FGF (FGFr), de los que FGFr1 y FGFr2 intervienen directamente en el proceso formación y maduración de las vainas de mielina, así como para formar las interacciones funcionales entre el axón y la vaina de mielina (Furusko et al., 2012).

CONCLUSIONES

- 1.- Las células mesenquimales derivadas de médula ósea son viables a medio plazo tras ser trasplantadas en parénquima nervioso y, sin previa inducción neural en cultivo, no muestran capacidad de diferenciación neural u oligodendrogénica.
- 2.- El trasplante de células mesenquimales derivadas de médula ósea promueve la activación de progenitores de oligodendrocitos que estaban en estado inactivo debido al tratamiento con cuprizona.
- 3.- Los progenitores de oligodendrocitos migran hacia la periferia del trasplante donde ejercen su efecto de forma local.
- 4.- Los progenitores de oligodendrocitos se diferencian en oligodendrocitos maduros que remielinizan los axones periféricos al trasplante de células mesenquimales derivadas de médula ósea.
- 5.- La mielina formada restablece la velocidad de conducción nerviosa de los axones remielinizados.
- 6.- Estos efectos se deben a factores tróficos secretados por las células mesenquimales derivadas de médula ósea, que activan los nichos neurogénicos y promueven la proliferación, diferenciación, supervivencia y migración de los progenitores de oligodendrocitos originados de estos nichos.
- 7.- En concreto FGF8, sintetizado y liberado por las MSCs, es capaz de promover por si mismo todas las etapas de la remielinización.
- 8.- Las células de la pulpa y ligamento periodontal humanas no incrementan la remielinización de la zona trasplantada, aunque las células del ligamento periodontal muestran propiedades neuroregeneradoras.
- 9.- El trasplante de oligodendrocitos inmortalizados 158N, pese a que obtiene tasas de remielinización mayores al resto de tipos celulares estudiados, no son adecuados para su uso en terapia celular debido a su elevada capacidad invasiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Adibhatla, R. M. & Hatcher, J. F. (2008). Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Sub-cellular Biochemistry*, 49, 241-268.
- Aggarwal, S., Yurlova, L. & Simons, M. (2011). Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends in Cell Biology*, 21(10), 585-93.
- Agostini, S., Mancuso, R., Guerini, F. R., D'Alfonso, S., Agliardi, C., Hernis, A., Zanzottera, M., Barizzone, N, Leone, M. A., Caputo, D., Rovaris, M. & Clerici, M. (2018). HLA alleles modulate EBV viral load in multiple sclerosis. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 80.
- Aktas, O., Kieseier, B. & Hartung, H. P. (2010). Neuroprotection, Regeneration and Immunomodulation: Broadening the Therapeutic Repertoire in Multiple Sclerosis. *Trends Neuroscience*, 33(3), 140-152.
- Albrecht, P. J., Murtie, J. C., Ness, J. K., Redwine, J. M., Enterline, J. R., Armstrong, R. C. & Levison, S. W. (2003). Astrocytes produce CNTF during the remyelination phase of viral-induced spinal cord demyelination to stimulate FGF-2 production. *Neurobiology of Disease*, 13(2), 89-101.
- Armstrong, R. C. (2007). Growth Factor Regulation of Remyelination: Behind the Growing Interest in Endogenous Cell Repair of the CNS. *Future Neurology*, 2(6), 689-697.
- Armstrong, R. C., Le, T. Q., Flint, N. C., Vana, A. C. & Zhou, Y. X. (2006). Endogenous Cell Repair of Chronic Demyelination. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(3), 245-256.
- Arnett, F. C., Gourh, P., Shete, S., Ahn, C. W., Honey, R. E., Agarwal, S. K., Tan, F. K., McNearney, T., Fischbach, M., Fritzler, M. J., Mayes, M. D. & Reveille, J. D. (2010). Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69(5), 822-827. Erratum in: *Ann Rheum Dis*. 2011, 70(5), 880.
- Arnold, D. L., Narayanan, S. & Antel, S. (2013). Neuroprotection with Glatiramer Acetate: Evidence from the Precise Trial. *Journal of Neurology*, 260(7), 1901-1906.
- Arthur, A., Shi, S., Zannettino, A. C., Fujii, N., Gronthos, S. & Koblar, S. A. (2009). Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells*, 27(9), 2229-2237.

- Bai, L., Lennon, D. P., Eaton, V., Maier, K., Caplan, A. I., Miller, S. D. & Miller, R.H. (2009). Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce Th2-Polarized Immune Response and Promote Endogenous Repair in Animal Models of Multiple Sclerosis. *Glia*, 57(11) 1192-1203.
- Baker, D. & Amor, S. (2015). Mouse Models of Multiple Sclerosis: Lost in Translation?. *Current Pharmaceutical Design*, 21(18), 2440-2452.
- Ballerini, C., Campani, D., Rombolà, G., Gran, B., Nacmias, B., Amato, M. P., Siracusa, G., Bartolozzi, L., Sorbi, S. & Massacesi, L. (2000). Association of apolipoprotein E polymorphism to clinical heterogeneity of multiple sclerosis. *Neuroscience Letters*, 296(2-3), 174-176.
- Barhum, Y., Gai-Castro, S., Bahat-Stromza, M., Barzilay, R., Melamed, E. & Offen, D. (2010). Intracerebroventricular Transplantation of Human Mesenchymal Stem Cells Induced to Secrete Neurotrophic Factors Attenuates Clinical Symptoms in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Journal of Molecular Neuroscience*, 41(1), 129-137.
- Baron, W., Shattil, S. J. & Ffrench-Constant, C. (2002). The Oligodendrocyte Precursor Mitogen PDGF Stimulates Proliferation by Activation of Alpha(V)Beta3 Integrins. *The EMBO Journal*, 21(8), 1957-1966.
- Barres, B. A., Raff, M. C., Gaese, F., Bartke, I., Dechant, G. & Barde, Y. A. (1994). A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development. *Nature*, 367(6461), 371-375.
- Barres, B. A., Schmid, R., Sendnter, M. & Raff, M. C. (1993). Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development*, 118(1), 283-95.
- Beck, K. D., Powell-Braxton, L., Widmer, H. R., Valverde, J. & Hefti, F. (1995). Igf1 Gene Disruption Results in Reduced Brain Size, CNS Hypomyelination, and Loss of Hippocampal Granule and Striatal Parvalbumin-Containing Neurons. *Neuron*, 14(4), 717-730.
- Beenken, A. & Mohammadi, M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 8(3), 235-253.
- Benoist, C. & Mathis, D. (2001). Autoimmunity Provoked by Infection: How Good is the Case for T Cell Epitope Mimicry?. *Nature Immunology*, 2(9), 797-801.
- Bittner, S., Ruck, T., Wiend, L. H., Grauer, O. M. & Meuth, S.G. (2017). Targeting B Cells in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: From Pathophysiology to Optimal Clinical Management. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 10(1), 51-66.

- Bjarnadóttir, K., Benkhoucha, M., Merkler, D., Weber, M. S., Payne, N. L., Bernard, C. C. A., Molnarfi, N. & Lalive, P. H. B. (2016). Cell-Derived Transforming Growth Factor-Beta1 Expression Limits the Induction Phase of Autoimmune Neuroinflammation. *Scientific Reports*, 6(6), 34594.
- Blakemore, W. F. & Franklin, R. J. (1991). Transplantation of glial cells into the CNS. *Trends in Neurosciences*, 14(8), 323-327.
- Bo, L., Geurts, J. J., Van Der Valk, P., Polman, C. & Barkhof, F. (2007). Lack of Correlation between Cortical Demyelination and White Matter Pathologic Changes in Multiple Sclerosis. *Archives of Neurology*, 64(1), 76-80.
- Bonab, M. M., Sahraian, M. A., Aghsaie, A., Karvigh, S. A., Hosseinian, S. M., Nikbin, B., Lotfi, J., Khorramnia, S., Motamed, M. R., Togha, M., Harirchian, M. H., Moghadam, N. B., Alikhani, K., Yadegari, S., Jafarian, S. & Gheini, M. R. (2012). Autologous Mesenchymal Stem Cell Therapy in Progressive Multiple Sclerosis: An Open Label Study. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 7(6), 407-414.
- Bonilla, S., Silva, A., Valdés, L., Geijo, E., García-Verdugo, J. M. & Martínez, S. (2005). Functional neural stem cells derived from adult bone marrow. *Neuroscience*, 133(1), 85-95.
- Botella-López, A., Garcia-Lopez, R., Pombero, A. & Martinez, S. (2019). Radial glia fibers translate Fgf8 morphogenetic signals to generate a thalamic nuclear complex protomap in the mantle layer. *Brain Structure and Function*, 224(2), 661-679.
- Boyd, J. G. & Gordon, T. (2002). A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *The European Journal of Neuroscience*, 15(4), 613-626.
- Brinkmann, V., Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G., Aradhye, S. & Burtin, P. (2010). Fingolimod (FTY720): Discovery and Development of an Oral Drug to Treat Multiple Sclerosis. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 9(11), 883-897.
- Bruno, S., Deregibus, M. C. & Camussi, G. (2015). The Secretome of Mesenchymal Stromal Cells: Role of Extracellular Vesicles in Immunomodulation. *Immunology Letters*, 168(2), 154-158.
- Brüstle, O., Jones, K. N., Learish, R. D., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O. D., Duncan, I. D. & McKay, R. D. (1999). Embryonic Stem Cell-Derived Glial Precursors: A Source of Myelinating Transplants. *Science*, 285(5428), 754-756.

- Bueno, C., Ramirez, C., Rodríguez-Lozano, F. J., Tabarés-Seisdedos, R., Rodenas, M., Moraleda, J. M., Jones, J. R. & Martinez, S. (2013). Human adult periodontal ligament-derived cells integrate and differentiate after implantation into the adult mammalian brain. *Cell Transplantation*, 22(11), 2017-2028.
- Bunge, M. B. (2001). Bridging Areas of Injury in the Spinal Cord. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 7(4), 325-339.
- Burt, R. K., Marmont, A., Oyama, Y., Slavin, S., Arnold, R., Hiepe, F., Fassas, A., Snowden, J., Schuening, F., Myint, H., Patel, D. D., Collier, D., Heslop, H., Krance, R., Statkute, L., Verda, L., Traynor, A., Kozak, T., Hintzen, R. Q., Rose, J. W., Voltarelli, J., Loh, Y., Territo, M., Cohen, B. A., Craig, R. M., Varga, J. & Barr, W. G. (2006). Randomized Controlled Trials of Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Autoimmune Diseases: The Evolution from Myeloablative to Lymphoablative Transplant Regimens. *Arthritis and Rheumatism*, 54(12), 3750-3760.
- Campbell, G. R., Ziabreva, I., Reeve, A. K., Krishnan, K. J., Reynolds, R., Howell, O., Lassmann, H., Turnbull, D. M. & Mahad, D. J. (2011). Mitochondrial DNA Deletions and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology*, 69(3), 481-492.
- Cantarella, C., Cayre, M., Magalon, K. & Durbec, P. (2008). Intranasal HB-EGF administration favors adult SVZ cell mobilization to demyelinated lesions in mouse corpus callosum. *Developmental Neurobiology*, 68(2), 223-236.
- Caplan, A. I. (2007). Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 341-347.
- Caplan, A. I. & Dennis, J. E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98(5), 1076-1084.
- Carreras, E., Saiz, A., Marín, P., Martínez, C., Rovira, M., Villamor, N., Aymerich, M., Lozano, M., Fernández-Avilés, F., Urbano-Ispizua, A., Montserrat, E. & Graus, F. (2003). CD34+ Selected Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation for Multiple Sclerosis: Report of Toxicity and Treatment Results at One Year of Follow-Up in 15 Patients. *Haematologica*, 88(3), 306-314.
- Casanova, B., Martínez-Bisbal, M. C., Valero, C., Celda, B., Martí-Bonmatí, L., Pascual, A., Landente, L. & Coret, F. (2003). Evidence of Wallerian Degeneration in Normal Appearing White Matter in the Early Stages of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A HMRS Study. *Journal of Neurology*, 250(1), 22-28.

- Cayre, M., Bancila, M., Virard, I., Borges, A. & Durbec, P. (2006). Migrating and Myelinating Potential of Subventricular Zone Neural Progenitor Cells in White Matter Tracts of the Adult Rodent Brain. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 31(4), 748-758.
- Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., Bringas, P. Jr., Han, J., Rowitch, D. H., Soriano, P., McMahon, A. P. & Sucov, H. M. (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, 127(8), 1671-1679.
- Chandran, S., Kato, H., Gerreli, D., Compston, A., Svendsen, C. N. & Allen, N. D. (2003). FGF-dependent generation of oligodendrocytes by a hedgehog-independent pathway. *Development*, 130(26), 6599-6609.
- Chang, A., Tourtellotte, W. W., Rudick, R. & Trapp, B. D. (2002). Premyelinating Oligodendrocytes in Chronic Lesions of Multiple Sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 346(3), 165-173.
- Chanvillard, C., Millward, J. M., Lozano, M., Hamann, I., Paul, F., Zipp, F., Dörr, J. & Infante-Duarte, C. (2012). Mitoxantrone Induces Natural Killer Cell Maturation in Patients with Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *PLoS One*, 7(6), e39625.
- Chari, D. M. (2007). Remyelination in Multiple Sclerosis. *International Review of Neurobiology*, 79, 589-620.
- Chari, D. M., Crang, A. J. & Blakemore, W. F. (2003a). Decline in Rate of Colonization of Oligodendrocyte Progenitor Cell (OPC)-Depleted Tissue by Adult OPCs with Age. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62(9), 908-916.
- Chari, D. M., Huang, W. L. & Blakemore, W. F. (2003b). Dysfunctional Oligodendrocyte Progenitor Cell (OPC) Populations may Inhibit Repopulation of OPC Depleted Tissue. *Journal of Neuroscience Research*, 73(6), 787-793.
- Cohen, J. A. (2013). Mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 333(1-2), 43-49.
- Comi, G., Kappos, L., Clanet, M., Ebers, G., Fassas, A., Fazekas, F., Filippi, M., Hartung, H. P., Hertenstein, B., Karussis, D., Martino, G., Tyndall, A. & van der Meché, F. G. (2000). Guidelines for Autologous Blood and Marrow Stem Cell Transplantation in Multiple Sclerosis: A Consensus Report Written on Behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation and the European Charcot Foundation. BMT-MS Study Group. *Journal of Neurology*, 247(5), 376-382.

- Confavreux, C., Li, D. K., Freedman, M. S., Truffinet, P., Benzerdjeb, H., Wang, D., Bar-Or, A., Traboulsee, A. L., Reiman, L. E., O'Connor, P. W., & Teriflunomide Multiple Sclerosis Trial Group. (2012). Long-Term Follow-Up of a Phase 2 Study of Oral Teriflunomide in Relapsing Multiple Sclerosis: Safety and Efficacy Results Up to 8.5 Years. *Multiple Sclerosis*, 18(9), 1278-1289.
- Connick, P., Kolappan, M., Crawley, C., Webber, D. J., Patani, R., Michell, A. W., Du, M. Q., Luan, S. L., Altmann, D. R., Thompson, A. J., Compston, A., Scott, M. A., Miller, D. H. & Chandran, S. (2012). Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *The Lancet. Neurology*, 11(2), 150-156.
- Connick, P., Kolappan, M., Crawley, C., Webber, D. J., Patani, R., Michell, A. W., Du, M. Q., Luan, S. L., Altmann, D. R., Thompson, A. J., Compston, A., Scott, M. A., Miller, D. H. & Chandran, S. (2012). Autologous Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Secondary Progressive Multiple Sclerosis: An Open-Label Phase 2a Proof-of-Concept Study. *The Lancet. Neurology*, 11(2), 150-156.
- Connick, P., Kolappan, M., Patani, R., Scott, M. A., Crawley, C., He, X. L., Richardson, K., Barber, K., Webber, D. J., Wheeler-Kingshott, C. A., Tozer, D. J., Samson, R. S., Thomas, D. L., Du, M. Q., Luan, S. L., Michell, A. W., Altmann, D. R., Thompson, A. J., Miller, D. H., Compston, A. & Chandran, S. (2011). The mesenchymal stem cells in multiple sclerosis (MSCIMS) trial protocol and baseline cohort characteristics: an open-label pre-test: post-test study with blinded outcome assessments. *Trials*, 12, 62.
- Cosgaya, J. M., Chan, J. R. & Shooter, E. M. (2002). The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science*, 298(5596), 1245-1248.
- Crossley, P. H. & Martin, G. R. (1995). The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development*, 121(2), 439-51.
- Crossley, P. H., Martinez, S. & Martin, G. R. (1996). Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature*, 380(6569), 66-68.
- Cruz-Martinez, P., González-Granero, S., Molina-Navarro, M. M., Pacheco-Torres, J., García-Verdugo, J. M., Geijo-Barrientos, E., Jones, J. & Martinez, S. (2016). Intraventricular injections of mesenchymal stem cells activate endogenous functional remyelination in a chronic demyelinating murine model. *Cell Death and Disease*, 7, e2223. Erratum in: *Cell Death Dis.* 2017, 8(5), e2809.

- Cruz-Martinez, P., Martinez-Ferre, A., Jaramillo-Merchán, J., Estirado, A., Martinez, S. & Jones, J. (2014). FGF8 activates proliferation and migration in mouse post-natal oligodendrocyte progenitor cells. *PLoS One*, 9(9), e108241.
- Czepiel, M., Boddeke, E. & Copray, S. (2015). Human Oligodendrocytes in Remyelination Research. *Glia*, 63(4), 513-530.
- De Chiara, G., Marocci, M. E., Sgarbanti, R., Civitelli, L., Ripoli, C., Piacentini, R., Garaci, E., Grassi, C. & Palamara, A. T. (2012). Infectious Agents and Neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, 46(3), 614-638.
- Decker, L., Lachapelle, F., Magy, L., Picard-Riera, N., Nait-Oumesmar, B. & Baron-Van Evercooren, A. (2005). Fibroblast Growth Factors in Oligodendrocyte Physiology and Myelin Repair. *Ernst Schering Research Foundation Workshop*, 53, 39-59.
- Del Valle, I., Elvira, G., Garcia-Benzaquen, L., Armesilla-Diaz, A., Kremer, L., Garcia-Sanz, J. A., Martinez, S. & Silva, A. (2010). Characterization of novel monoclonal antibodies able to identify neurogenic niches and arrest neurosphere proliferation and differentiation. *Neuroscience*, 169(3), 1473-1485.
- DeLuca, G. C., Williams, K., Evangelou, N., Ebers, G. C. & Esiri, M. M. (2006). The Contribution of Demyelination to Axonal Loss in Multiple Sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 129(Pt 6), 1507-1516.
- Doetsch, F., & Alvarez-Buylla, A. (1996). Network of Tangential Pathways for Neuronal Migration in Adult Mammalian Brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), 14895-14900.
- Drago, D., Cossetti, C., Iraci, N., Gaude, E., Musco, G., Bachi, A. & Pluchino, S. (2013). The Stem Cell Secretome and its Role in Brain Repair. *Biochimie*, 95(12), 2271-2285.
- Eriksdotter-Jönhagen, M., Nordberg, A., Amberla, K., Bäckman, L., Ebendal, T., Meyerson, B., Olson, L., Seiger, Shigeta, M., Theodorsson, E., Viitanen, M., Winblad, B. & Wahlund, L. O. (1998). Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease. *Demential and Geriatric Cognitive Disorders*, 9(5), 246-257.
- Feutz, A. C., Pham-Dinh, D., Allinquant, B., Miehe, M. & Ghandour, M. S. (2001). An immortalized jimpy oligodendrocyte cell line: defects in cell cycle and cAMP pathway. *Glia*, 34(4), 241-252.
- Fierz, W. (2017). Multiple Sclerosis: An Example of Pathogenic Viral Interaction?. *Virology Journal*, 14(1), 42.

- Figuroa, F. E., Carrión, F., Villanueva, S. & Khoury, M. (2012). Mesenchymal Stem Cell Treatment for Autoimmune Diseases: A Critical Review. *Biological Research*, 45(3), 269-277.
- Fletcher, J. M., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Tubridy, N. & Mills, K.H. (2010). T Cells in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 162(1), 1-11.
- Flügel, A., Matsumuro, K., Neumann, H., Klinkert, W. E., Birnbacher, R., Lassmann, H. & Otten, U., Wekerle, H. (2001). Anti-Inflammatory Activity of Nerve Growth Factor in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Inhibition of Monocyte Transendothelial Migration. *European Journal of Immunology*, 31(1), 11-22.
- Földes, A., Kádár, K., Kerémi, B., Zsembery, Á., Gyires, K. S., Zádori, Z. & Varga, G. (2016). Mesenchymal Stem Cells of Dental Origin-Their Potential for Antiinflammatory and Regenerative Actions in Brain and Gut Damage. *Current Neuropharmacology*, 14(8), 914-934.
- Fortin, D., Rom, E., Sun, H., Yayan, A. & Bansal, R. (2005). Distinct fibroblast growth factor (FGF)/FGF receptor signaling pairs initiate diverse cellular responses in the oligodendrocyte lineage. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(32), 7470-7479.
- Fox, N. C., Jenkins, R., Leary, S. M., Stevenson, V. L., Losseff, N. A., Crum, W. R., Harvey, R. J., Rossor, M. N., Miller, D. H. & Thompson, A. J. (2000). Progressive Cerebral Atrophy in MS: A Serial Study using Registered, Volumetric MRI. *Neurology*, 54(4), 807-812.
- Franklin, R. J. (2002). Why does Remyelination Fail in Multiple Sclerosis?. *Nature Reviews. Neuroscience*, 3(9), 705-714.
- Franklin, R. J. & Blakemore, W. F. (1997). Transplanting oligodendrocyte progenitors into the adult CNS. *Journal of Anatomy*, 190(Pt 1), 23-33.
- Franklin, R. J. & Ffrench-Constant, C. (2008). Remyelination in the CNS: From Biology to Therapy. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(11), 839-855.
- Franklin, R. J., Gilson, J. M., Franceschini, I. A. & Barnett, S. C. (1996). Schwann Cell-Like Myelination Following Transplantation of an Olfactory Bulb-Ensheathing Cell Line into Areas of Demyelination in the Adult CNS. *Glia*, 17(3), 217-224.
- Franklin, R. J. & Kotter, M. R. (2008). The Biology of CNS Remyelination: The Key to Therapeutic Advances. *Journal of Neurology*, 255(Suppl 1), 19-25.

- Franklin, R. J., Zhao, C. & Sim, F. J. (2002). Ageing and CNS Remyelination. *Neuroreport*, 13(7), 923-928.
- Freedman, M. S., Bar-Or, A., Atkins, H. L., Karussis, D., Frassoni, F., Lazarus, H., Scolding, N., Slavin, S., Le Blanc, K., Uccelli, A., MSCT Study Group. (2010). The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell Transplantation as a Treatment for Multiple Sclerosis: Consensus Report of the International MSCT Study Group. *Multiple Sclerosis*, 16(4), 503-510.
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F. & Kulagina, N. N. (1976). Fibroblast Precursors in Normal and Irradiated Mouse Hematopoietic Organs. *Experimental Hematology*, 4(5), 267-274.
- Frischer, J. M., Bramow, S., Dal-Bianco, A., Lucchinetti, C. F., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., Sorensen, P. S. & Lassmann, H. (2009). The Relation between Inflammation and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis Brains. *Brain: A Journal of Neurology*, 132(Pt 5), 1175-1189.
- Furusho, M., Dupree, J. L., Nave, K. A. & Bansal, R. (2012). Fibroblast growth factor receptor signaling in oligodendrocytes regulates myelin sheath thickness. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(19), 6631-6641.
- Furusho, M., Kaga, Y., Ishii, A., Hébert, J. M. & Bansal, R. (2011). Fibroblast growth factor signaling is required for the generation of oligodendrocyte progenitors from the embryonic forebrain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(13), 5055-5066.
- Gao, J., Dennis, J. E., Muzic, R. F., Lundberg, M. & Caplan, A.I. (2001). The Dynamic in Vivo Distribution of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells After Infusion. *Cells, Tissues, Organs*, 169(1), 12-20.
- Genoud, S., Maricic, I., Kumar, V. & Gage, F. H. (2005). Targeted Expression of IGF-1 in the Central Nervous System Fails to Protect Mice from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, 168(1-2), 40-45.
- Gerdoni, E., Gallo, B., Casazza, S., Musio, S., Bonanni, I., Pedemonte, E., Mantegazza, R., Frassoni, F., Mancardi, G., Pedotti, R. & Uccelli, A. (2007). Mesenchymal Stem Cells Effectively Modulate Pathogenic Immune Response in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Annals of Neurology*, 61(3), 219-227.
- Gold, S. M. & Voskuhl, R. R. (2016). Pregnancy and Multiple Sclerosis: From Molecular Mechanisms to Clinical Application. *Seminars in Immunopathology*, 38(6), 709-718.

- Goldenberg, M. M. (2012). Multiple Sclerosis Review. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 37(3), 175-184.
- Goldman, S. (2005). Stem and Progenitor Cell-Based Therapy of the Human Central Nervous System. *Nature Biotechnology*, 23(7), 862-871.
- Goldman, S. A. & Sim, F. (2005). Neural Progenitor Cells of the Adult Brain. *Novartis Foundation Symposium*, 265, 66-80; discussion 82-97.
- Gonzalez-Perez, O. & Alvarez-Buylla, A. (2011). Oligodendrogenesis in the Subventricular Zone and the Role of Epidermal Growth Factor. *Brain Research Reviews*, 67(1-2), 147-156.
- Gonzalez-Perez, O., Romero-Rodriguez, R., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. (2009). Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. *Stem Cells*, 27(8), 2032-2043. Erratum in: *Stem Cells*. 2009, 27(12), 3122.
- Goodin, D. S. (2014). Glucocorticoid Treatment of Multiple Sclerosis. *Handbook of Clinical Neurology*, 122, 455-464.
- Goodin, D. S. (2016). The Epidemiology of Multiple Sclerosis: Insights to a Causal Cascade. *Handbook of Clinical Neurology*, 138, 173-206.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G. & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of National Academy of Science of the U. S. A.*, 97(25), 13625-13630.
- Groves, A. K., Entwistle, A., Jat, P. S. & Noble, M. (1993). The characterization of astrocyte cell lines that display properties of glial scar tissue. *Developmental Biology*, 159(1), 87-104.
- Gupta, R. & Sen, N. (2016). Traumatic Brain Injury: A Risk Factor for Neurodegenerative Diseases. *Reviews in the Neurosciences*, 27(1), 93-100.
- Haider, L., Fischer, M. T., Frischer, J. M., Bauer, J., Höftberger, R., Botond, G., Esterbauer, H., Binder, C. J., Witztum, J. L. & Lassmann, H. (2011). Oxidative Damage in Multiple Sclerosis Lesions. *Brain: A Journal of Neurology*, 134(Pt 7), 1914-1924.
- Harris, V. K., Stark, J., Vyshkina, T., Blackshear, L., Joo, G., Stefanova, V., Sara, G. & Sadiq, S. A. (2018). Phase I Trial of Intrathecal Mesenchymal Stem Cell-derived Neural Progenitors in Progressive Multiple Sclerosis. *EBioMedicine*, 29, 23-30.
- Hemmer, B., Archelos, J. J. & Hartung, H. P. (2002). New Concepts in the Immunopathogenesis of Multiple Sclerosis. *Nature Reviews. Neuroscience*, 3(4), 291-301.

- Herbert, A. L. & Monk, K. R. (2017). Advances in Myelinating Glial Cell Development. *Current Opinion in Neurobiology*, 42, 53-60.
- Hermann, A., Gastl, R., Liebau, S., Popa, M. O., Fiedler, J., Boehm, B. O., Maisel, M., Lerche, H., Schwarz, J., Brenner, R. & Storch, A. (2004). Efficient Generation of Neural Stem Cell-Like Cells from Adult Human Bone Marrow Stromal Cells. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 19), 4411-4422.
- Horwitz, E. M., Prockop, D. J., Fitzpatrick, L. A., Koo, W. W., Gordon, P. L., Neel, M., Sussman, M., Orchard P., Marx, J. C., Pyeritz, R. E. & Brenner, M. K. (1999). Transplantability and Therapeutic Effects of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Cells in Children with Osteogenesis Imperfecta. *Nature Medicine*, 5(3), 309-313.
- Huang, A. H., Snyder, B. R., Cheng, P. H. & Chan, A. W. (2008). Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. *Stem Cells*, 26(10), 2654-2663.
- Jiang, F., Frederick, T. J. & Wood, T. L. (2001). IGF-I Synergizes with FGF-2 to Stimulate Oligodendrocyte Progenitor Entry into the Cell Cycle. *Developmental Biology*, 232(2), 414-423.
- Jones, J., Jaramillo-Merchán, J., Bueno, C., Pastor, D., Viso-León, M. & Martínez, S. (2010). Mesenchymal Stem Cells Rescue Purkinje Cells and Improve Motor Functions in a Mouse Model of Cerebellar Ataxia. *Neurobiology of Disease*, 40(2), 415-423.
- Kang, S. H., Fukaya, M., Yang, J. K., Rothstein, J. D. & Bergles, D. E. (2010). NG2+ CNS Glial Progenitors Remain Committed to the Oligodendrocyte Lineage in Postnatal Life and Following Neurodegeneration. *Neuron*, 68(4), 668-681.
- Karussis, D., Karageorgiou, C., Vaknin-Dembinsky, A., Gowda-Kurkalli, B., Gomori, J. M., Kassis, I., Bulte, J. W., Petrou, P., Ben-Hur, T., Abramsky, O. & Slavin, S. (2010). Safety and Immunological Effects of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients with Multiple Sclerosis and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Archives of Neurology*, 67(10), 1187-1194.
- Karussis, D. & Kassis, I. (2008a). The Potential use of Stem Cells in Multiple Sclerosis: An Overview of the Preclinical Experience. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 110(9), 889-896.
- Karussis, D., Kassis, I., Kurkalli, B. G. & Slavin, S. (2008b). Immunomodulation and Neuroprotection with Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells (MSCs): A Proposed Treatment for Multiple Sclerosis and Other Neuroimmunological/Neurodegenerative Diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, 265(1-2), 131-135.

- Kasarekło, K., Cudnoch-Jędrzejewska, A., Członkowski, A. & Mirowska-Guzel, D. (2017). Mechanism of Action of Three Newly Registered Drugs for Multiple Sclerosis Treatment. *Pharmacological Reports: PR*, 69(4), 702-708.
- Kessaris, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M. & Richardson, W. D. (2006). Competing Waves of Oligodendrocytes in the Forebrain and Postnatal Elimination of an Embryonic Lineage. *Nature Neuroscience*, 9(2), 173-179.
- Koç, O. N., Peters, C., Aubourg, P., Raghavan, S., Dyhouse, S., DeGasperi, R., Kolodny, E. H., Yoseph, Y. B., Gerson, S. L., Lazarus, H. M., Caplan, A. I., Watkins, P. A. & Krivit, W. (1999). Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Remain Host-Derived Despite Successful Hematopoietic Engraftment After Allogeneic Transplantation in Patients with Lysosomal and Peroxisomal Storage Diseases. *Experimental Hematology*, 27(11), 1675-1681.
- Konala, V. B., Mamidi, M. K., Bhone, R., Das, A. K., Pochampally, R. & Pal, R. (2016). The Current Landscape of the Mesenchymal Stromal Cell Secretome: A New Paradigm for Cell-Free Regeneration. *Cytotherapy*, 18(1), 13-24.
- Kornek, B., Storch, M. K., Weissert, R., Wallstroem, E., Stefferl, A., Olsson, T., Linington, C., Schmidbauer, M. & Lassmann, H. (2000). Multiple Sclerosis and Chronic Autoimmune Encephalomyelitis: A Comparative Quantitative Study of Axonal Injury in Active, Inactive, and Remyelinated Lesions. *The American Journal of Pathology*, 157(1), 267-276.
- Kotter, M. R., Li, W. W., Zhao, C. & Franklin, R. J. (2006). Myelin Impairs CNS Remyelination by Inhibiting Oligodendrocyte Precursor Cell Differentiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(1), 328-332.
- Krampera, M., Franchini, M., Pizzolo, G. & Aprili, G. (2007). Mesenchymal Stem Cells: From Biology to Clinical Use. *Blood Transfusion = Trasfusione Del Sangue*, 5(3), 120-129.
- Kremenutzky, M., Cottrell, D., Rice, G., Hader, W., Baskerville, J., Koopman, W. & Ebers, G. C. (1999). The Natural History of Multiple Sclerosis: A Geographically Based Study. 7. Progressive-Relapsing and Relapsing-Progressive Multiple Sclerosis: A Re-Evaluation. *Brain: A Journal of Neurology*, 122(Pt 10), 1941-1950.
- Kriegstein, A. & Alvarez-Buylla, A. (2009). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 149-184.
- Kuhlmann, T., Miron, V., Cui, Q., Wegner, C., Antel, J. & Brück, W. (2008). Differentiation Block of Oligodendroglial Progenitor Cells as a Cause for Remyelination Failure in Chronic Multiple Sclerosis. *Brain*, 131, 1749-1758.

- Kumar, S., Biancotti, J. C., Yamaguchi, M. & de Vellis, J. (2007). Combination of Growth Factors Enhances Remyelination in a Cuprizone-Induced Demyelination Mouse Model. *Neurochemical Research*, 32(4-5), 783-797.
- Kurtzke, J. F. (1983). Rating Neurologic Impairment in Multiple Sclerosis: An Expanded Disability Status Scale (EDSS). *Neurology*, 33(11), 1444-1452.
- Lassmann, H. (2011). Review: The Architecture of Inflammatory Demyelinating Lesions: Implications for Studies on Pathogenesis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 37(7), 698-710.
- Lassmann, H., Brück, W. & Lucchinetti, C. F. (2007). The Immunopathology of Multiple Sclerosis: An Overview. *Brain Pathology*, 17(2), 210-218.
- Lassmann, H., Niedobitek, G., Aloisi, F., Middeldorp, J. M. & NeuroproMiSe EBV Working Group. (2011). Epstein-Barr virus in the multiple sclerosis brain: a controversial issue--report on a focused workshop held in the Centre for Brain Research of the Medical University of Vienna, Austria. *Brain*, 134(Pt 9), 2772-2786.
- Le Blanc, K. & Ringden, O. (2006). Mesenchymal Stem Cells: Properties and Role in Clinical Bone Marrow Transplantation. *Current Opinion in Immunology*, 18(5), 586-591.
- Lee, K. J. & Jessell, T. M. (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 22, 261-294.
- Lee, R. H., Seo, M. J., Pulin, A. A., Gregory, C. A., Ylostalo, J. & Prockop, D. J. (2009). The CD34-Like Protein PODXL and Alpha6-Integrin (CD49f) Identify Early Progenitor MSCs with Increased Clonogenicity and Migration to Infarcted Heart in Mice. *Blood*, 113(4), 816-826.
- Lee, S. M., Danielian, P. S., Fritsch, B. & McMahon, A. P. (1997). Evidence that FGF8 signalling from the midbrain-hindbrain junction regulates growth and polarity in the developing midbrain. *Development*, 124(5), 959-969.
- Levine, J. (2016). The reactions and role of NG2 glia in spinal cord injury. *Brain Research*, 1638(Pt B), 199-208.
- Levine, J. M., Reynolds, R. & Fawcett, J. W. (2001). The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends in Neurosciences*, 24(1), 39-47.

- Llufriu, S., Sepúlveda, M., Blanco, Y., Marín, P., Moreno, B., Berenguer, J., Gabilondo, I., Martínez-Heras, E., Sola-Valls, N., Arnaiz, J. A., Andreu, E. J., Fernández, B., Bullich, S., Sánchez-Dalmau, B., Graus, F., Villoslada, P. & Saiz, A. (2014). Randomized Placebo-Controlled Phase II Trial of Autologous Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis. *PLoS One*, 9(12), e113936.
- Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-Distance Neuronal Migration in the Adult Mammalian Brain. *Science*, 264(5162), 1145-1148.
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain Migration of Neuronal Precursors. *Science*, 271(5251), 978-981.
- Lublin, F. D., Whitaker, J. N., Eidelman, B. H., Miller, A. E., Arnason, B. G. & Burks, J. S. (1996). Management of Patients Receiving Interferon Beta-1b for Multiple Sclerosis: Report of a Consensus Conference. *Neurology*, 46(1), 12-18.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M. & Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination. *Annals of Neurology*, 47(6), 707-717.
- Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R. & Aloisi, F. (2007). Meningeal B-Cell Follicles in Secondary Progressive Multiple Sclerosis Associate with Early Onset of Disease and Severe Cortical Pathology. *Brain: A Journal of Neurology*, 130(Pt 4), 1089-1104.
- Magliozzi, R., Howell, O. W., Reeves, C., Roncaroli, F., Nicholas, R., Serafini, B., Aloisi, F. & Reynolds, R. A. (2010). Gradient of Neuronal Loss and Meningeal Inflammation in Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology*, 68(4), 477-493.
- Mailand, M. T. & Frederiksen, J. L. (2017). Vaccines and Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *Journal of Neurology*, 264(6), 1035-1050.
- Marik, C., Felts, P. A., Bauer, J., Lassmann, H. & Smith, K. J. (2007). Lesion Genesis in a Subset of Patients with Multiple Sclerosis: A Role for Innate Immunity?. *Brain: A Journal of Neurology*, 130(Pt 11), 2800-2815.
- Martinez, S., Crossley, P. H., Cobos, I., Rubenstein, J. L. & Martin, G. R. (1999). FGF8 induces formation of an ectopic isthmus organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on *Otx2* expression. *Development*, 126(6), 1189-200.

- Martinez-Ferre, A. & Martinez, S. (2009). The development of the thalamic motor learning area is regulated by Fgf8 expression. *The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(42), 13389-13400.
- Mason, C. & Dunnill, P. A. (2008). Brief Definition of Regenerative Medicine. *Regenerative Medicine*, 3(1), 1-5.
- Mason, I., Chambers, D., Shamim, H., Walshe, J. & Irving, C. (2000). Regulation and function of FGF8 in patterning of midbrain and anterior hindbrain. *Biochemistry and Cell Biology*, 78(5), 577-584.
- McKinnon, R. D., Matsui, T., Aranda, M. & Dubois-Dalcq, M. (1991). A role for fibroblast growth factor in oligodendrocyte development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 638, 378-386.
- McKinnon, R. D., Matsui, T., Dubois-Dalcq, M. & Aaronson, S. A. (1990). FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron*, 5(5), 603-614.
- McKinnon, R. D., Smith, C., Behar, T., Smith, T. & Dubois-Dalcq, M. (1993). Distinct effects of bFGF and PDGF on oligodendrocyte progenitor cells. *Glia*, 7(3), 245-254.
- Mead, B., Logan, A., Berry, M., Leadbeater, W. & Scheven, B. A. (2017). Concise Review: Dental Pulp Stem Cells: A Novel Cell Therapy for Retinal and Central Nervous System Repair. *Stem Cells*, 35(1), 61-67.
- Meinl, E., Krumbholz, M., Derfuss, T., Junker, A. & Hohlfeld, R. (2008). Compartmentalization of Inflammation in the CNS: A Major Mechanism Driving Progressive Multiple Sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 274(1-2), 42-44.
- Méndez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., Macarthur, B. D., Lira, S. A., Scadden, D. T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G. N. & Frenette, P. S. (2010). Mesenchymal and Haematopoietic Stem Cells Form a Unique Bone Marrow Niche. *Nature*, 466(7308), 829-834.
- Menn, B., Garcia-Verdugo, J. M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D. & Alvarez-Buylla, A. (2006). Origin of Oligodendrocytes in the Subventricular Zone of the Adult Brain. *The Journal of Neuroscience*, 26(30), 7907-7918.
- Mentis, A. A., Dardiotis, E., Grigoriadis, N., Petinaki, E. & Hadjigeorgiou, G. M. (2017). Viruses and Endogenous Retroviruses in Multiple Sclerosis: From Correlation to Causation. *Acta Neurologica Scandinavica*, 136(6), 606-616.

- Miller, R. H. & Bai, L. (2007). Cellular Approaches for Stimulating CNS Remyelination. *Regenerative Medicine*, 2(5), 817-829.
- Miller, R. H. & Fyffe-Maricich, S. L. (2010). Restoring the Balance between Disease and Repair in Multiple Sclerosis: Insights from Mouse Models. *Disease Models & Mechanisms*, 3(9-10), 535-539.
- Milo, R. & Miller, A. (2014). Revised Diagnostic Criteria of Multiple Sclerosis. *Autoimmunity Reviews*, 13(4-5), 518-524.
- Minguell, J. J., Erices, A. & Conget, P. (2001). Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Biology and Medicine*, 226(6), 507-520.
- Mitew, S., Hay, C. M., Peckham, H., Xiao, J., Koening, M. & Emery, B. (2014). Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. *Neuroscience*, 276, 29-47.
- Mothe, A. J., Kulbatski, I., Parr, A., Mohareb, M. & Tator, C. H. (2008a). Adult spinal cord stem/progenitor cells transplanted as neurospheres preferentially differentiate into oligodendrocytes in the adult rat spinal cord. *Cell Transplantation*, 17(7), 735-751.
- Mothe, A. J. & Tator, C. H. (2008b). Transplanted neural stem/progenitor cells generate myelinating oligodendrocytes and Schwann cells in spinal cord demyelination and dysmyelination. *Experimental Neurology*, 213(1), 176-190.
- Mühlhausen, J., Kitze, B., Huppke, P., Müller, G. A. & Koziolok, M. J. (2015). Apheresis in Treatment of Acute Inflammatory Demyelinating Disorders. *Atherosclerosis. Supplements*, 18, 251-256.
- Murray, J. A. & Blakemore, W. F. (1980). The relationship between internodal length and fibre diameter in the spinal cord of the cat. *Journal of the Neurological Science*, 45(1), 29-41.
- Musina, R. A., Bekchanova, E. S., Belyavskii, A. V. & Sukhikh, G. T. (2006). Differentiation potential of mesenchymal stem cells of different origin. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 141(1), 147-51.
- Nait-Oumesmar, B., Decker, L., Lachapelle, F., Avellana-Adalid, V., Bachelin, C. & Baron-Van Evercooren, A. (1999). Progenitor Cells of the Adult Mouse Subventricular Zone Proliferate, Migrate and Differentiate into Oligodendrocytes After Demyelination. *The European Journal of Neuroscience*, 11(12), 4357-4366.

- Nave, K. A. (2010a). Myelination and Support of Axonal Integrity by Glia. *Nature*, 468(7321), 244-252.
- Nave, K. A. (2010b). Myelination and the Trophic Support of Long Axons. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(4), 275-283.
- Nave, K. A., Lai, C., Bloom, F. E. & Milner, R. J. (1986). Jimpy Mutant Mouse: A 74-Base Deletion in the mRNA for Myelin Proteolipid Protein and Evidence for a Primary Defect in RNA Splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(23), 9264-9268.
- Nexø, B. A., Christensen, T., Frederiksen, J., Møller-Larsen, A., Oturai, A. B., Villesen, P., Hansen, B., Nissen, K. K., Laska, M. J., Petersen, T. S., Bonnesen, S., Hedemand, A., Wu, T., Wang, X., Zhang, X., Brudek, T., Maric, R., Søndergaard, H. B., Sellebjerg, F., Brusgaard, K., Kjeldbjerg, A. L., Rasmussen, H. B., Nielsen, A. L., Nyegaard, M., Petersen, T., Børglum, A. D. & Pedersen, F. S. (2011). The etiology of multiple sclerosis: genetic evidence for the involvement of the human endogenous retrovirus HERV-Fc1. *PLoS One*, 6(2), e16652.
- Ng, B. K., Chen, L., Mandemakers, W., Cosgaya, J. M. & Chan, J. R. (2007). Anterograde transport and secretion of brain-derived neurotrophic factor along sensory axons promote Schwann cell myelination. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(28), 7597-7603.
- Niino, M. & Miyazaki, Y. (2015). Genetic polymorphisms related to vitamin D and the therapeutic potential of vitamin D in multiple sclerosis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 93(5), 319-325.
- Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R. & Zhu, X. (2009). Polydendrocytes (NG2 Cells): Multifunctional Cells with Lineage Plasticity. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(1), 9-22.
- Nishiyama, A., Lin, X. H., Giese, N., Heldin, C. H., Stallcup, W. B. (1996a). Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, 43(3), 299-314.
- Nishiyama, A., Lin, X. H., Giese, N., Heldin, C. H., Stallcup, W. B. (1996b). Interaction between NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells is required for optimal response to PDGF. *Journal of Neuroscience Research*, 43(3), 315-30.
- Nishiyama, A., Watanabe, M., Yang, Z. & Bu, J. (2002). Identity, distribution, and development of polydendrocytes: NG2-expressing glial cells. *Journal of Neurocytology*, 31(6-7), 437-455.

- Nishiyama, A., Yang, Z. & Butt, A. (2005). Astrocytes and NG2-glia: what's in a name?. *Journal of Anatomy*, 207(6), 687-693.
- Nielsen, H. H., Ladeby, R., Drøjdahl, N., Peterson, A. C. & Finsen, B. (2006). Axonal degeneration stimulates the formation of NG2+ cells and oligodendrocytes in the mouse. *Glia*, 54(2), 105-115.
- Nistor, G. I., Totoiu, M. O., Haque, N., Carpenter, M. K. & Keirstead, H. S. (2005). Human Embryonic Stem Cells Differentiate into Oligodendrocytes in High Purity and Myelinate After Spinal Cord Transplantation. *Glia*, 49(3), 385-396.
- Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L. & Kriegstein, A. R. (2004). Cortical Neurons Arise in Symmetric and Asymmetric Division Zones and Migrate through Specific Phases. *Nature Neuroscience*, 7(2), 136-144.
- Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M. & Weinshenker, B. G. (2000). Multiple Sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 343(13), 938-952.
- Nutt, J. G., Burchiel, K. J., Comella, C. L., Jankovic, J., Lang, A. E., Laws, E. R. Jr., Lozano, A. M., Penn, R. D., Simpson, R. K. Jr., Stacy, M., Wooten, G. F. & ICV GDNF Study Group. Implanted intracerebroventricular. Glial cell line-derived neurotrophic factor. (2003). Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology*, 60(1), 69-73.
- Nylander, A. & Hafler, D. A. (2012). Multiple Sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1180-1188.
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T. & Nishimune, Y. (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters*, 407(3), 313-319.
- Okuda, D. T. (2014). Immunosuppressive Treatments in Multiple Sclerosis. *Handbook of Clinical Neurology*, 122, 503-511.
- Olek, M. J. & Jonathan-Howard, M. D. (2019). *Diagnosis of Multiple Sclerosis in Adults*. *Uptodate*, Available from: <http://www.uptodate.com/contents/diagnosis-of-multiple-sclerosis-in-adults?source=search_result&search=multiple+sclerosis&selectedTitle=2~150>.
- Olerup, O. & Hillert, J. (1991). HLA Class II-Associated Genetic Susceptibility in Multiple Sclerosis: A Critical Evaluation. *Tissue Antigens*, 38(1), 1-15.
- Parmar, M. & Li, M. (2007). Early specification of dopaminergic phenotype during ES cell differentiation. *BMC Developmental Biology*, 7, 86.

- Perez-Carmona, N., Fernandez-Jover, E. & Sempere, A. P. (2019). Epidemiology of multiple sclerosis in Spain. *Revista de Neurología*, 69(1), 32-38.
- Perlman, S. & Zhao, J. (2017). Roles of Regulatory T Cells and IL-10 in Virus-Induced Demyelination. *Journal of Neuroimmunology*, 308, 6-11.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. & Marshak, D. R. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 284(5411), 143-147.
- Platel, J. C., Gordon, V., Heintz, T. & Bordey, A. (2009). GFAP-GFP Neural Progenitors are Antigenically Homogeneous and Anchored in their Enclosed Mosaic Niche. *Glia*, 57(1), 66-78.
- Popescu, B & Lucchinetti, C. (2016). Multiple Sclerosis. A Mechanistic View. *Alireza Minagar ed., Elsevier Inc, Chapter 9 - Neuropathology of Multiple Sclerosis*, 181-200.
- Popescu, B & Lucchinetti, C. (2016). Handbook of Clinical Neurology. *Elsevier Inc, Chapter 6 - Immunopathology: Autoimmune Glial Diseases and Differentiation from Multiple Sclerosis*, 95-106.
- Praksova, P., Stourac, P., Bednarik, J., Vickova, E., Mikulkova, Z. & Michalek, J. (2012). Immunoregulatory T Cells in Multiple Sclerosis and the Effect of Interferon Beta and Glatiramer Acetate Treatment on T Cell Subpopulations. *Journal of the Neurological Sciences*, 319(1-2), 18-23.
- Prieto-Gonzalez, J. M. (2014). Treatment of Multiple Sclerosis Symptoms and Exacerbations. *Medicina Clinica*, 143(3), 39-43.
- Ranganath, S. H., Levy, O., Inamdar, M. S. & Karp, J. M. (2012). Harnessing the Mesenchymal Stem Cell Secretome for the Treatment of Cardiovascular Disease. *Cell Stem Cell*, 10(3), 244-258.
- Rivera, F. J. & Aigner, L. (2012). Adult Mesenchymal Stem Cell Therapy for Myelin Repair in Multiple Sclerosis. *Biological Research*, 45(3), 257-268.
- Rivera, F. J., Kandasamy, M., Couillard-Despres, S., Caioni, M., Sanchez, R., Huber, C., Weidner, N., Bogdahn, U. & Aigner, L. (2008). Oligodendrogenesis of Adult Neural Progenitors: Differential Effects of Ciliary Neurotrophic Factor and Mesenchymal Stem Cell Derived Factors. *Journal of Neurochemistry*, 107(3), 832-843.

- Rivera, F. J., Siebzehnruhl, F. A., Kandasamy, M., Couillard-Despres, S., Caioni, M., Poehler, A. M., Berninger, B., Sandner, B., Bogdahn, U., Goetz, M., Bluemcke, I., Weidner, N. & Aigner, L. (2009). Mesenchymal Stem Cells Promote Oligodendroglial Differentiation in Hippocampal Slice Cultures. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 24(3-4), 317-324.
- Rivera, F. J., Sierralta, W. D., Minguell, J. J. & Aigner, L. (2006). Adult Hippocampus Derived Soluble Factors Induce a Neuronal-Like Phenotype in Mesenchymal Stem Cells. *Neuroscience Letters*, 406(1-2), 49-54.
- Rivera, F. J., Steffenhagen, C., Kremer, D., Kandasamy, M., Sandner, B., Couillard-Despres, S., Weidner, N., Küry, P. & Aigner, L. (2010). Deciphering the Oligodendrogenic Program of Neural Progenitors: Cell Intrinsic and Extrinsic Regulators. *Stem Cells and Development*, 19(5), 595-606.
- Roach, A., Takahashi, N., Pravtcheva, D., Ruddle, F. & Hood, L. 1985. Chromosomal Mapping of Mouse Myelin Basic Protein Gene and Structure and Transcription of the Partially Deleted Gene in Shiverer Mutant Mice. *Cell*, 42(1), 149-155.
- Rodríguez-Lozano, F. (2009). Aislamiento, caracterización y plasticidad de las células madre de la pulpa dental. Tesis Doctoral. *Universidad de Murcia*.
- Rovira, A., Tintoré, M., Alvarez-Cermeño, J. C., Izquierdo, G. & Prieto, J. M. (2010). Recommendations for using and Interpreting Magnetic Resonance Imaging in Multiple Sclerosis. *Neurología*, 25(4), 248-265.
- Roxo, M. R., Franceschini, P. R., Zubaran, C., Kleber, F. D. & Sander, J. W. (2011). The Limbic System Conception and its Historical Evolution. *TheScientificWorldJournal*, 11, 2428-2441.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T. B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D. R. & Sanberg, P. R. (2000). Adult Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neural Cells in Vitro. *Experimental Neurology*, 164(2), 247-256.
- Sasaki, M., Black, J. A., Lankford, K. L., Tokuno, H. A., Waxman, S. G. & Kocsis, J. D. (2006). Molecular reconstruction of nodes of Ranvier after remyelination by transplanted olfactory ensheathing cells in the demyelinated spinal cord. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(6), 1803-1812.
- Schinköthe, T., Bloch, W. & Schmidt, A. (2008). In vitro secreting profile of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 17(1), 199-206.

- Schwab, M. E., Kapfhammer, J. P. & Bandtlow, C. E. (1993). Inhibitors of neurite growth. *Annual Review of Neuroscience*, 16, 565-595.
- Sellers, D. L., Maris, D. O. & Horner, P. J. (2009). Postinjury Niches Induce Temporal Shifts in Progenitor Fates to Direct Lesion Repair After Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(20), 6722-6733.
- Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P. G., Wang, C. Y. & Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429), 149-155.
- Seri, B., García-Verdugo, J. M., McEwen, B. S. & Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes Give Rise to New Neurons in the Adult Mammalian Hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(18), 7153-7160.
- Sibley, W. A., Bamford, C. R. & Clark, K. (1985). Clinical Viral Infections and Multiple Sclerosis. *Lancet*, 1(8441), 1313-1315.
- Sim, F. J., Zhao, C., Penderis, J. & Franklin, R. J. (2002). The age-related decrease in CNS remyelination efficiency is attributable to an impairment of both oligodendrocyte progenitor recruitment and differentiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(7), 2451-2459.
- Smith, K. J., Blakemore, W. F. & McDonald, W. I. (1979). Central remyelination restores secure conduction. *Nature*, 280(5721), 395-396.
- Smith, K. J., Blakemore, W. F. & McDonald, W. I. (1981). The restoration of conduction by central remyelination. *Brain*, 104(2), 383-404.
- Smith, K. J., Blakemore, W. F., Murray, J. A. & Patterson, R. C. (1982). Internodal Myelin Volume and Axon Surface Area. A Relationship Determining Myelin Thickness?. *Journal of the Neurological Sciences*, 55(2), 231-246.
- Smith, K. J. & Schauf, C. L. (1981). Size-dependent variation of nodal properties in myelinated nerve. *Nature*, 293(5830), 297-299.
- Smith, K. M., Ohkubo, Y., Maragnoli, M. E., Rasin, M. R., Schwartz, M. L., Sestan, N. & Vaccarino, F. M. (2006). Midline radial glia translocation and corpus callosum formation require FGF signaling. *Nature Neuroscience*, 9(6), 787-797.

- Snaidero, N., Möbius, W., Czopka, T., Hekking, L. H., Mathisen, C., Verkleij, D., Goebbels, S., Edgar, J., Merkler, D., Lyons, D. A., Nave, K. A. & Simons, M. (2014). Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell*, 156(1-2), 277-290.
- Stangel, M. & Hartung, H. P. (2002). Remyelinating Strategies for the Treatment of Multiple Sclerosis. *Progress in Neurobiology*, 68(5), 361-376.
- Stankoff, B., Aigrot, M. S., Noël, F., Wattilliaux, A., Zalc, B. & Lubetzki, C. 2002. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(21), 9221-9227.
- Steingen, C., Brenig, F., Baumgartner, L., Schmidt, J., Schmidt, A. & Bloch, W. (2008). Characterization of Key Mechanisms in Transmigration and Invasion of Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 44(6), 1072-1084.
- Stidworthy, M. F., Genoud, S., Suter, U., Mantei, N. & Franklin, R. J. (2003). Quantifying the Early Stages of Remyelination Following Cuprizone-Induced Demyelination. *Brain Pathology*, 13(3), 329-339.
- Storm, E. E., Garel, S., Borello, U., Hebert, J. M., Martinez, S., McConnell, S. K., Martin, G. R. & Rubenstein, J. L. (2006). Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers. *Development*, 133(9), 1831-1844.
- Talbott, J. F., Cao, Q., Bertram, J., Nkansah, M., Benton, R. L., Lavik, E. & Whittemore, S. R. (2007). CNTF promotes the survival and differentiation of adult spinal cord-derived oligodendrocyte precursor cells in vitro but fails to promote remyelination in vivo. *Experimental Neurology*, 204(1), 485-489.
- Tanavde, V., Vaz, C., Rao, M. S., Vemuri, M. C. & Pochampally, R. R. (2015). Research using Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Quality Metric Towards Developing a Reference Material. *Cytotherapy*, 17(9), 1169-1177.
- Toma, C., Wagner, W. R., Bowry, S., Schwartz, A. & Villanueva, F. (2009). Fate of Culture-Expanded Mesenchymal Stem Cells in the Microvasculature: In Vivo Observations of Cell Kinetics. *Circulation Research*, 104(3), 398-402.
- Trapp, B. D. & Nave, K. A. (2008). Multiple Sclerosis: An Immune Or Neurodegenerative Disorder?. *Annual Review of Neuroscience*, 31, 247-269.

- Turinetto, V. Vitale, E. & Giachino, C. (2016). Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), E1164.
- Uccelli, A., Laroni, A., Brundin, L., Clanet, M., Fernandez, O., Nabavi, S. M., Muraro, P. A., Oliveri, R. S., Radue, E. W., Sellner, J., Soelberg-Sorensen, P., Sormani, M. P., Wuerfel, J. T., Battaglia, M. A., Freedman, M. S. & MESEMS study group. (2019). MEsenchymal StEm cells for Multiple Sclerosis (MESEMS): a randomized, double blind, cross-over phase I/II clinical trial with autologous mesenchymal stem cells for the therapy of multiple sclerosis. *Trials*, 20(1), 263.
- Uccelli, A., Milanese, M., Principato, M. C., Morando, S., Bonifacino, T., Vergani, L., Giunti, D., Voci, A., Carminati, E., Giribaldi, F., Caponnetto, C. & Bonanno, G. (2012). Intravenous Mesenchymal Stem Cells Improve Survival and Motor Function in Experimental Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular Medicine*, 18(18), 794-804.
- Uccelli, A. Moretta, L. & Pistoia, V. (2006). Immunoregulatory Function of Mesenchymal Stem Cells. *European Journal of Immunology*, 36(10), 2566-2573.
- Uría, D. F. (2000). HLA and multiple sclerosis. Studies of a spanish population. *Revista de Neurología*, 31(11), 1066-1070.
- Vanderlugt, C. L. & Miller, S. D. (2002). Epitope Spreading in Immune-Mediated Diseases: Implications for Immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*, 2(2), 85-95.
- Vellosillo, L., Muñoz, M. P. & Paíno, C. L. (2017). Adipose tissue-derived stromal cells (ADSC) express oligodendrocyte and myelin markers, but they do not function as oligodendrocytes. *Histochemistry and Cell Biology*, 148(5), 503-515.
- Voumvourakis, K. I., Antonelou, R. Ch., Kitsos, D. K., Stamboulis, E. & Tsiodras, S. (2011). TGF-Beta/BMPs: Crucial Crossroad in Neural Autoimmune Disorders. *Neurochemistry International*, 59(5), 542-550.
- Wang, H., Wang, B., Normoyle, K. P., Jackson, K., Spitler, K., Sharrock, M. F., Miller, C. M., Best, C., Llano, D. & Du, R. (2014). Brain Temperature and its Fundamental Properties: A Review for Clinical Neuroscientists. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 307.
- Wang, S., Bates, J., Li, X., Schanz, S., Chandler-Militello, D., Levine, C., Maherali, N., Studer, L., Hochedlinger, K., Windrem, M. & Goldman, S. A. (2013). Human iPSC-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells can Myelinate and Rescue a Mouse Model of Congenital Hypomyelination. *Cell Stem Cell*, 12(2), 252-264.

- Waxman, S. G. (2008a). Axonal Dysfunction in Chronic Multiple Sclerosis: Meltdown in the Membrane. *Annals of Neurology*, 63(4), 411-413.
- Waxman, S. G. (2008b). Mechanisms of Disease: Sodium Channels and Neuroprotection in Multiple Sclerosis-Current Status. *Nature Clinical Practice.Neurology*, 4(3), 159-169.
- Wilkins, A., Chandran, S. & Compston, A. (2001). A role for oligodendrocyte-derived IGF-1 in trophic support of cortical neurons. *Glia*, 36(1), 48-57.
- Wilkins, A., Majed, H., Layfield, R., Compston, A. & Chandran, S. (2003). Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(12), 4967-4974.
- Williams, A., Piaton, G., Aigrot, M. S., Belhadi, A., Théaudin, M., Petermann, F., Thomas, J. L., Zalc, B. & Lubetzki, C. (2007). Semaphorin 3A and 3F: Key Players in Myelin Repair in Multiple Sclerosis?. *Brain*, 130(Pt10), 2554-2565.
- Wingerchuk, D. M. & Carter, J. L. (2014). Multiple Sclerosis: Current and Emerging Disease-Modifying Therapies and Treatment Strategies. *Mayo Clinic Proceedings*, 89(2), 225-240.
- Wolswijk, G. & Noble, M. (1992). Cooperation between PDGF and FGF Converts Slowly Dividing O-2A adult Progenitor Cells to Rapidly Dividing Cells with Characteristics of O-2A perinatal Progenitor Cells. *The Journal of Cell Biology*, 118(4), 889-900.
- Xu, J., Liu, Z. & Ornitz, D. M. (2000). Temporal and spatial gradients of Fgf8 and Fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures. *Development*, 127(9), 1833-1843.
- Yamout, B., Hourani, R., Salti, H., Barada, W., El-Hajj, T., Al-Kutoubi, A., Herlopian, A., Baz, E. K., Mahfouz, R., Khalil-Hamdan, R., Kreidieh, N. M., El-Sabban, M. & Bazarbachi, A. (2010). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients with Multiple Sclerosis: A Pilot Study. *Journal of Neuroimmunology*, 227(1-2), 185-189.
- Ye, P. & D'Ercole, A. J. (1999). Insulin-like growth factor I protects oligodendrocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced injury. *Endocrinology*, 140(7), 3063-3072.
- Zhang, J., Li, Y., Chen, J., Cui, Y., Lu, M., Elias, S. B., Mitchell, J. B., Hammill, L., Vanguri, P. & Chopp, M. (2005). Human Bone Marrow Stromal Cell Treatment Improves Neurological Functional Recovery in EAE Mice. *Experimental Neurology*, 195(1), 16-26.

- Zhang, J., Shan, Q., Ma, P., Jiang, Y., Chen, P., Wen, J., Zhou, Y., Qian, H. & Pei, X. (2004). Differentiation Potential of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Retina in Normal and Laser-Injured Rat Eye. *Science in China. Series C, Life Sciences*, 47(3), 241-250.
- Ziabreva, I., Campbell, G., Rist, J., Zambonin, J., Rorbach, J., Wydro, M. M., Lassmann, H., Franklin, R. J. & Mahad, D. (2010). Injury and Differentiation Following Inhibition of Mitochondrial Respiratory Chain Complex IV in Rat Oligodendrocytes. *Glia*, 58(15), 1827-1837.
- Zimmerlin, L., Park, T. S., Zambidis, E. T., Donnenberg, V. S. & Donnenberg, A. D. (2013). Mesenchymal Stem Cell Secretome and Regenerative Therapy After Cancer. *Biochimie*, 95(12), 2235-2245.
- Zivadinov, R., Dwyer, M. G., Hussein, S., Carl, E., Kennedy, C., Andrews, M., Hojnacki, D., Heininen-Brown, M., Willis, L., Cherneva, M., Bergsland, N. & Weinstock-Guttman, B. (2012). Voxel-Wise Magnetization Transfer Imaging Study of Effects of Natalizumab and IFNbeta-1a in Multiple Sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 18(8), 1125-1134.

ANEXOS

OPEN

Citation: *Cell Death and Disease* (2013) 4, e779; doi:10.1038/cddis.2013.304
© 2013 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 2041-4889/13

www.nature.com/cddis

Mesenchymal stromal-cell transplants induce oligodendrocyte progenitor migration and remyelination in a chronic demyelination model

J Jaramillo-Merchán¹, J Jones¹, JL Ivorra², D Pastor³, MC Viso-León¹, JA Armengó⁴, MD Moltó², E Geijo-Barrientos¹ and S Martínez^{*1}

Demyelinating disorders such as leukodystrophies and multiple sclerosis are neurodegenerative diseases characterized by the progressive loss of myelin that may lead toward a chronic demyelination of the brain's white matter, impairing normal axonal conduction velocity and ultimately causing neurodegeneration. Current treatments modifying the pathological mechanisms are capable of ameliorating the disease; however, frequently, these therapies are not sufficient to repress the progressive demyelination into a chronic condition and permanent loss of function. To this end, we analyzed the effect that bone marrow-derived mesenchymal stromal cell (BM-MSc) grafts exert in a chronically demyelinated mouse brain. As a result, oligodendrocyte progenitors were recruited surrounding the graft due to the expression of various trophic signals by the grafted MSCs. Although there was no significant reaction in the non-grafted side, in the grafted regions oligodendrocyte progenitors were detected. These progenitors were derived from the nearby tissue as well as from the neurogenic niches, including the subependymal zone and dentate gyrus. Once near the graft site, the cells matured to myelinating oligodendrocytes. Finally, electrophysiological studies demonstrated that axonal conduction velocity was significantly increased in the grafted side of the fimbria. In conclusion, we demonstrate here that in chronic demyelinated white matter, BM-MSc transplantation activates oligodendrocyte progenitors and induces remyelination in the tissue surrounding the stem cell graft.

Cell Death and Disease (2013) 4, e779; doi:10.1038/cddis.2013.304; published online 29 August 2013

Subject Category: Experimental Medicine

Demyelinating disorders are a group of diseases characterized by myelin loss. The cause for this destruction is varied, such as an autoimmune attack (i.e., multiple sclerosis (MS))^{1,2} or metabolic/genetic alterations (leukodystrophy).³ The loss of myelin ultimately causes neuronal disruption, as the oligodendrocytes are crucial for both the metabolic support of the axons⁴ as well as the correct transmission of the nerve impulse.

Oligodendrocyte progenitor cells (OPCs), which express the NG2 proteoglycan,⁵ can be detected migrating and differentiating into mature oligodendrocytes as early as 7 days after a demyelinating lesion.⁶ These cells are extensively distributed in the central nervous system (CNS), are capable of dividing throughout the lifespan and are activated when there is a demyelinating process.⁷

MS can be divided into two main stages: acute and chronic. Although in the acute phase the nearby OPCs are capable of remyelinating the damaged axons,^{8–10} in the chronic phase

the cell's migratory and differentiating capabilities are altered, resulting in sustained and progressive demyelination.¹¹ This is at least partly because of the lack of factors that recruit and stimulate remyelinating properties of OPCs.¹² Thus, the objective of this work was to develop a remyelinating therapy in chronically demyelinated white matter based on activation of existing OPCs to induce migration and differentiation.

To this end, there are a number of studies concerning trophic-based activation of OPCs (reviewed by Rivera *et al.*¹³). Many of the identified trophic factors are known to be produced and secreted by bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BM-MSCs). Previous reports have proven that these cells are capable of inducing regeneration, neuroprotection and functional recovery in an MS mouse model.^{14–16} Though the cause for this effect *in vivo* is not well understood, there is evidence *in vitro* that BM-MSCs are capable of stimulating the proliferation and differentiation of neural progenitors toward an oligodendrocyte lineage.^{17,18}

¹Neuroscience Institute, University Miguel Hernandez-Spanish Council for Scientific Research (UMH-CSIC), Alicante, Spain; ²Department of Genetics, University of Valencia, CIBERSAM, INCLIVA, Valencia, Spain; ³Sports Science Research Center, University Miguel Hernandez, Elche, Spain and ⁴Department Physiology, Anatomy and Cell Biology, Pablo de Olavide University, Seville, Spain

*Corresponding author: S Martínez, Neuroscience Institute, University Miguel Hernandez-Spanish Council for Scientific Research (UMH-CSIC), Avda. Ramon y Cajal s/n. 03550, San Juan, Alicante, Spain. Tel: +34 96 5919556; Fax: +34 96 5919555; E-mail: smartinez@umh.es

Keywords: mesenchymal stromal cells; demyelinating mouse model; trophic release; oligodendrocyte activation; remyelination

Abbreviations: BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BM-MSc, bone marrow-derived mesenchymal stem cell; CC, corpus callosum; CNS, central nervous system; cSEZ, caudal subependymal zone; DG, dentate gyrus; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FGF, fibroblast growth factor; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GFP, green fluorescent protein; IGF, insulin-like growth factor; LV, lateral ventricle; MBP, myelin basic protein; MS, multiple sclerosis; MSC, mesenchymal stem cell; NGF- β , nerve growth factor β ; NT3, neurotrophic factor-3; NT4/5, neurotrophic factor-4/5; OPC, oligodendrocyte progenitor cell; PB, phosphate buffer; PDGF, platelet-derived growth factor; PFA, paraformaldehyde; SEZ, subependymal zone; TEM, transmission electron microscopy

Received 08.4.13; revised 08.7.13; accepted 16.7.13; Edited by Y Shi

Here we describe the use of BM-MSC in a model of chronic demyelination. This approach will give us insight as to the mechanisms by which BM-MSCs may activate OPCs *in vivo*, and ultimately induce remyelination and axonal conduction improvement.

Results

MSCs activate oligodendrogenesis and remyelination. After 12 weeks of cuprizone-embedded diet, the mice presented clear demyelinating lesions in the corpus callosum (CC) and fimbria (Figures 1b–d). However, although in the CC both myelinated and non-myelinated patches were detected (Figure 1c), the fimbria was rather homogeneously non-myelinated (Figure 1d). Thus, the surgical procedures were decided to be performed in this white matter structure.

As early as 2 weeks after stereotaxic-guided intra-fimbrial transplantation (Figure 2a), NG2-positive OPCs as well as mature oligodendrocytes (myelin basic protein (MBP +)) were detected surrounding the grafted cells (Figures 2b–d). The percentage of NG2, MBP and glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity was calculated and compared in the sham controls and stem cell-treated groups (Figures 2e–h). Concerning NG2, there was a slight increase in expression in the sham-treated group compared with its contralateral side, although not as remarkable as that observed in the stem cell-treated group, where over 10 times more NG2 was detected (Figures 2e and f). This was also observed in both MBP and GFAP staining, where the stem cell-injected fimbria presented higher levels of expression of these myelin and astrocyte markers, respectively, compared with the contralateral side (Figures 2e, g and h). The sham-treated fimbria did not differ

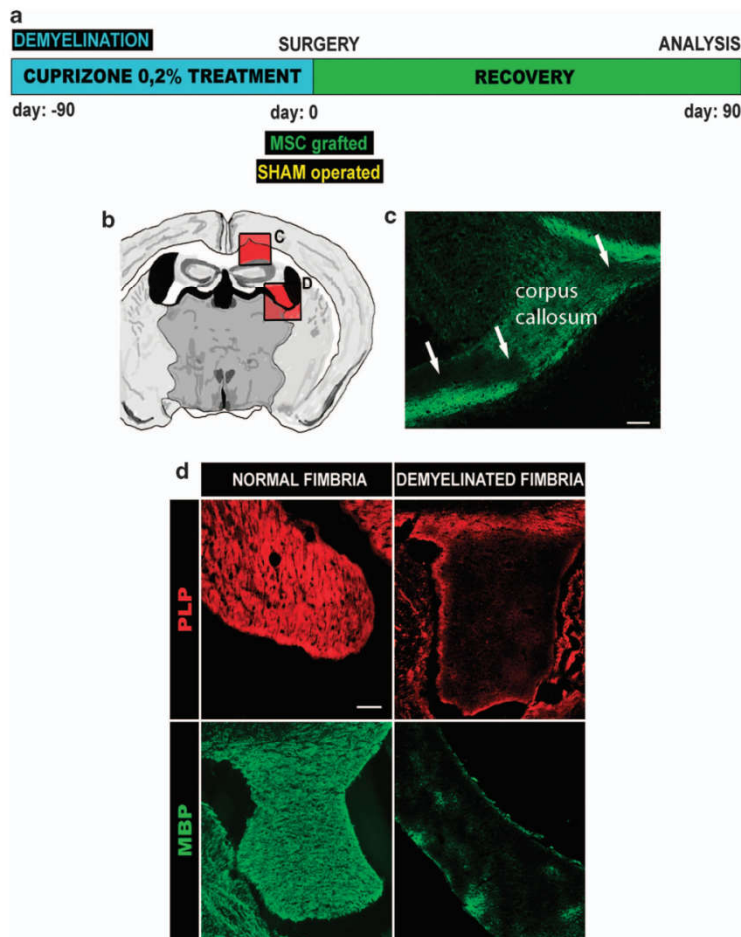


Figure 1 Effect of chronic intake of cuprizone in the CNS. (a) Chronogram of the experimental protocol. (b) Schematic representation of a transversal section of the brain, indicating with red squares the CC (c) and fimbria (d). (c) Immunohistochemistry of a transversal section of the CC of a mouse treated for 3 months with cuprizone and stained for MBP (in green). Arrows indicate patches of demyelination (MBP-negative), similar to that seen in chronic lesions of MS. (d) Proteolipid protein (PLP) (red) and MBP (green) staining in the fimbria of a non-treated mouse and of a cuprizone-treated mouse of the same age. Note the lack of expression of the two myelin-forming proteins, indicating a homogenous demyelination process of the fimbria. Scale bar, 75 μ m (c and d)

with its contralateral side in MBP staining, whereas for GFAP a slight increase was detected.

The results shown here indicate that there was a significant increase in OPCs and mature oligodendrocytes in the fimbria treated with MSCs, which in turn gave rise to newly formed myelin.

MSC transplantation increases the conduction velocity of demyelinated fibers. Axon conduction velocity was measured in order to confirm if the newly formed myelin around the MSC graft was functional (Figures 3a–d). In the recordings obtained with electrodes placed in the vicinity of the graft (see Materials and Methods), we detected two different populations of axons corresponding to fast- and slow-conducting axons (Figure 3e); in normal mice the average conduction velocity of these components was close to 1 and 0.4 m/s, respectively (measured at room temperature). The slow conduction fibers were absent when the region of the fimbria near the hippocampus was registered (Figure 3f).

The values of conduction velocity of fast-conduction fibers are given in Figure 3g. In normal (wild type), control demyelinated and sham-operated animals, the conduction velocity of the fast and slow (not shown) fibers was similar in all the regions tested (only rostral and caudal registered regions are shown). However, in stem cell-treated mice the conduction velocity of the fast fibers was almost twice as fast in the rostral region compared with the other groups ($t = 3.11$; P -value = 0.032), although the caudal region had increased values, though not statistically significant. The conduction velocity of the slow fibers did not change in any experimental condition (data not shown).

Thus, our electrophysiological analysis indicated that MSC transplants increased axon conduction speed of the area in the fimbria surrounding the graft. This effect is higher in the anterior region of the fimbria, which represents the axonal segments localized closer to the caudal subependymal zone (cSEZ) in relation to the graft.

MSCs activate oligodendrocyte progenitors by releasing trophic factors. As commented in the Introduction section, several authors have indicated that MSCs are capable of releasing a number of trophic factors that activate OPCs and induce their differentiation toward myelinating oligodendrocytes. Several factors that are known to induce this effect in OPCs were analyzed in MSCs both *in vitro* (before transplantation, Figure 4a) and *in vivo* (Figure 4b). As a result, neurotrophic factor-4/5 (NT4/5), neurotrophic factor-3 (NT3), platelet-derived growth factor (PDGF) and nerve growth factor- β (NGF- β) were detected both *in vitro* and *in vivo*. The contralateral (control) fimbria did not show any significant immunoreactivity of any of the factors analyzed. There was no immunoreactivity detected for these trophic factors in the sham group (data not shown). The combinations of several of these growth factors have been previously shown to be capable of inducing remyelination in cuprizone-treated mice.¹⁹

As no transdifferentiation or cell fusion processes were observed (data not shown), we conclude that the activation of native OPCs and oligodendrocytes was due to the release of at least these trophic factors by the grafted stem cells.

MSCs stimulate oligodendroglial differentiation and migration of cells from the SEZ and dentate gyrus of the hippocampus. The results shown so far indicate an activation of OPCs in the fimbria due to the paracrine effect of several trophic factors from the grafted MSCs. However, this increase in OPCs derives not only of nearby areas surrounding the fimbria, but possibly from the neurogenic niches, the SEZ and the dentate gyrus (DG) of the hippocampus. This phenomenon is possible because of the fact that the ventricular surface of the CC, caudal septum and fimbria coincide in the dorso-caudal pole of the lateral ventricle (LV), which advances over the ventricular surface of the hippocampal formation.

In the case of the SEZ, a number of NG2-positive cells were detected migrating from this region in the side of the fimbria where the stem cells were injected (Figure 5a). These cells presented cytoplasmic prolongations with a rostro-medial to caudo-lateral orientation and followed the SEZ of the right LV, with practically no invasion of the alveus or outer cortical hippocampal structures (Figures 5b–f).

To further confirm if the NG2-positive cells detected from the SEZ toward the fimbria originated in this area, Nilo1 expression was analyzed (Figure 5g). This marker is specific for neural precursors of the SEZ.²⁰ As a result, the vast majority of the NG2-positive cells also expressed Nilo1, confirming that they derive from the SEZ (cells in purple). Migrating NG2+ cells were not detected in the contralateral side of the fimbria, where no stem cells were injected (Figures 5h and i).

Also, the subgranular layer of the DG was analyzed in longitudinal sections, as this neurogenic area is relatively close to the grafted site (Figures 6a and b). Stronger MBP immunostaining was detected in the rostral fimbria near the DG with respect to more caudal areas of the fimbria (Figures 6c and d). Also, some cells seemed to detach from the distal pole of DG subgranular and migrated through the subepial region (Figures 6e–g), to finally invade the nearby fimbria parenchyma and even extend prolongations that surrounded the axons, similar to that observed in mature oligodendrocytes (Figures 6h–j). These NG2+ cells from the subgranular zone of the DG were Nilo1-negative (data not shown).

Discussion

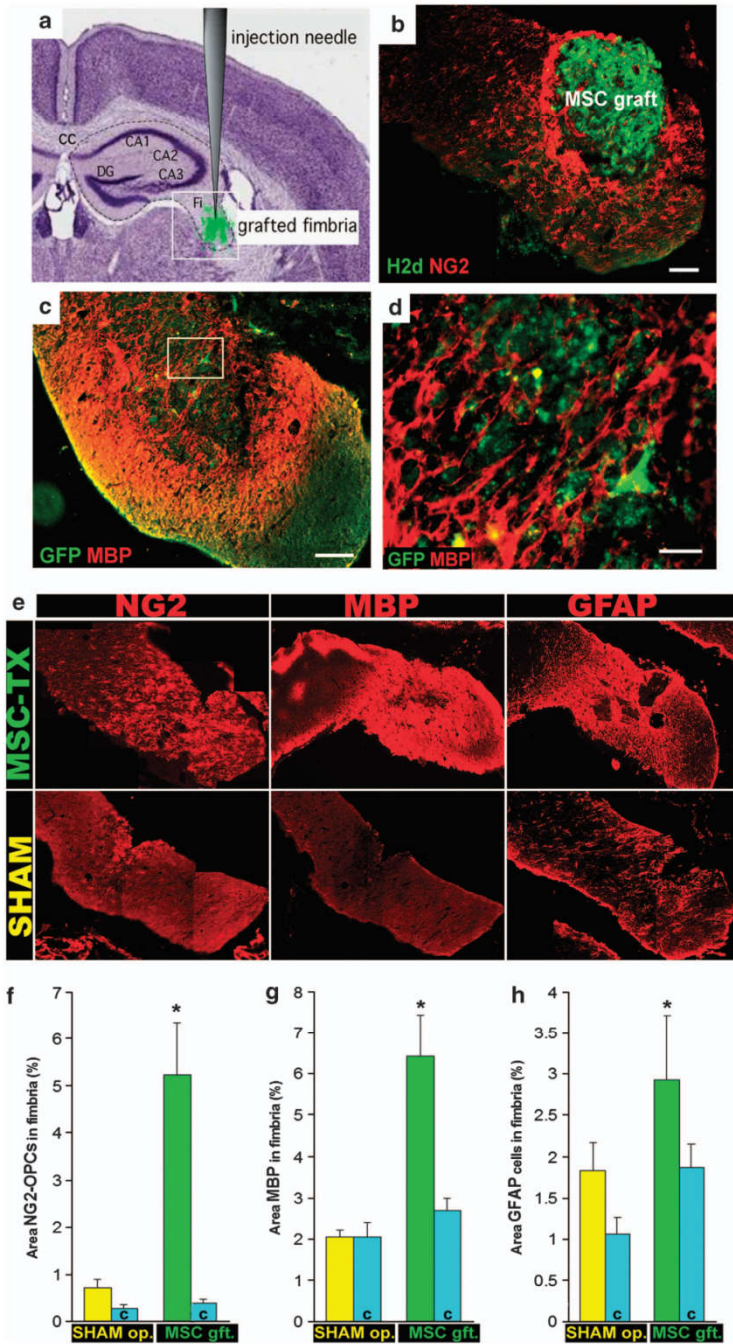
In this work, we analyzed the effect that MSC grafts have in a chronic demyelinated model. As a result, OPCs, identified as NG2+ cells, increased in number and migrated from the nearby neurogenic niches toward the graft, which include cells from the subependymal (NG2+/Nilo+) and subgranular (NG2+/Nilo-) zones (Figure 7). Furthermore, these progenitor cells matured into oligodendrocytes and remyelinated the surrounding area. This seemed to be due to the effect of various trophic factors secreted by the grafted MSCs, inducing OPC migration toward demyelinated white matter and differentiation to ultimately promote remyelination.

Toxicity-induced demyelinating models such as cuprizone are similar to the lesions that appear in MS, with massive apoptosis of oligodendrocytes; however, if the treatment is prematurely suspended, spontaneous remyelination occurs. This physiological remyelination occurs in two phases:

(A) OPC proliferation and colonization of the demyelinated area and (B) differentiation toward immature oligodendrocytes that contact with demyelinated axons, followed by OPC maturation and remyelination. This process is regulated by a

complex mechanism of coordinated expression of signaling factors (reviewed by Chari *et al.*^{8,9}).

OPCs are normally generated in the SEZ and DG of the hippocampus in adult animals. During development, OPCs



originate and migrate from the embryonic subventricular zone into the forebrain parenchyma.⁷ Caudally, these precursors migrate into the fimbria and hippocampus. Therefore, the fimbria represents an ideal area of interest to explore remyelination because of its localized source of OPCs from the cSEZ.

OPCs are constitutively present in the adult CNS and can specifically differentiate *in vivo* toward remyelinating oligodendrocytes. However, in some myelin diseases, such as in the primary progressive and evolution of relapsing-remitting MS, there is a multiple dysfunction in the remyelinating mechanisms that characterize the appearance of chronic lesions,²¹ similar to that observed in chronic cuprizone-treated mice.²² This may be because of either an absence of nearby OPCs or that they are quiescent and do not react to the signals that normally appear during the early stages of demyelination. In both cases, they may be due to, at least partly, the lack of factors that activate the necessary mechanisms to induce regeneration. Thus, it is of great importance to stimulate the quiescent OPCs, as well as induce their migration to the affected area.

There are numerous growth factors known to induce remyelination, including PDGF,²³ fibroblast growth factors (FGFs),²⁴ NT3²⁵ and insulin-like growth factor (IGF)-1.^{26,27} Also, certain combinations of growth factors work synergistically to repair and remyelinate. For example, FGF2 along with IGF activate OPCs,²⁸ whereas PDGF convert adult OPCs, which divide slowly, to 'newborn' progenitors with a higher proliferation rate.²⁹

However, there are certain disadvantages in using trophic factors alone as a possible treatment. One of the most important disadvantages is to find the proper dosage. An insufficient amount of the trophic factor would not have any effect on the remyelination process, but an excess may actually cause further damage. This was observed, for example, with brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion after an axotomy in rats.³⁰ In this work, high doses of the trophic factor inhibited motorneuron axonal regeneration. At the clinical level, ALS patients were administered intrathecally different doses of BDNF, causing an overall worsening compared with placebo.³¹ This cited article also shows another possible problem with growth factor treatment: the method of administration. Although oral intake may cause little to no effect on the tissue of interest, especially because many growth factors are not capable of surpassing the blood-brain barrier, direct injection or using micro-pumps has shown that the necessary concentration of the trophic factor to induce regeneration or neuroprotection may cause side effects that surpass the possible benefits. For example, NGF infusion in Alzheimer's disease patients resulted in a very slight cognitive

amelioration but accompanied by constant back pain that only disappeared when the treatment was halted.³² In addition, GDNF intraventricular delivery has been used in Parkinson's disease, which resulted in no clinical benefits and unwanted side effects.³³ The importance of adverse events demonstrate the biological activity of neurotrophic factors in human's neurodegenerative conditions and reveal the importance of adequate delivery pattern (continuous instead of intermittent) close to neuronal targets in physiological concentrations.

MSCs, on the other hand, are known to secrete a large array of factors.³⁴ These factors are released in an autocrine and paracrine way in response to the niche they are placed, in order to regenerate or protect nearby degenerating tissue. In MS, MSC transplantation presents an additional benefit, which resides in the modulation and suppression of the immunological response that characterizes this disease by inhibiting and regulating T-cell proliferation, as well as suppresses the inflammatory response.³⁵

Some of the factors that MSCs release are known to promote the differentiation of neural progenitor cells toward oligodendrocytes,³⁶ establishing an oligodendrocytic niche. We describe the expression of an array of growth factors. These trophic factors released by the MSC reach the neurogenic niches to promote OPC recruitment toward the source releasing them. These OPCs are active as they express NG2 and migrate from the caudal pole of the LV SEZ homolateral to the transplant. This stream of cells continues up to the graft, without abandoning the subependymal niche. Also, some OPCs from the DG of the hippocampus were observed.

Interestingly, in our sham controls we observed a slight increase in OPCs around the injection site. A previous study described that OPCs are activated when there is an ischemia, demyelination or other lesion in the CNS.³⁷ However, these OPCs were not capable of differentiating into mature oligodendrocytes nor initiate any reactive myelin formation, demonstrated by the absence of MBP immunoreaction.

Even though we observe the activation and maturation of OPCs in a chronic demyelinated tract, it is necessary to confirm that functional remyelination occurs. In chronic lesions of MS, the oligodendrocytes that survive in a demyelinating lesion and have lost their myelinating expansions are not capable of contributing to the remyelination, despite being capable of forming new myelin layers, because they cannot place these layers in the demyelinated axons (reviewed by Franklin³⁸). Thus, it is necessary to perform electrophysiological studies in order to confirm that the remyelination process observed here results in a functional recovery. In this work, we measured the conduction velocity of several areas in the periphery of the transplant. Under normal

Figure 2 OPCs around the graft site. (a) Diagram depicting the location of the injection site. The fimbria (Fi) is adjacent to the CC and the hippocampus, subdivided into CA1, CA2 and CA3. (b) MSC-grafted fimbria immunostained for H2d (green) and NG2 (red) in the injection site. In all cases, the graft stimulated OPC clustering. (c) Stem cell-treated fimbria immunostained for GFP (green) and MBP (red) in the injection site. (d) Close-up image of a region of the periphery of the graft (inset in c) staining for MBP (red) and GFP (green) where the stem cells can be seen intertwined with myelinated fibers. (e) NG2, MBP and GFAP expression (in red) in the fimbria of mesenchymal stem cell-grafted mice, sham-operated and the control demyelinated fimbria of the grafted mice. Note that the NG2 in MSC was taken 1 mm rostrally from the graft where no MSC were present. (f–h) Quantification of the expression of NG2 (f), MBP (g) and GFAP (h) in the fimbria of MSC-grafted mice (green bars), sham-operated (yellow bars) and the control fimbria (blue bars) of both groups. A significant increase of the NG2 expression ($t = -3.19$; P -value = 0.013), MBP expression ($t = -4.34$; P -value = 0.004) and GFAP expression ($t = -2.60$; P -value = 0.032) was detected in the MSC-grafted mice compared with the sham-operated mice, whereas no significant differences were detected in both control demyelinated fimbria (corresponding to the contralateral side of the fimbria) in sham-operated and control demyelinated fimbria in MSC-grafted. Scale bar, 100 μ m

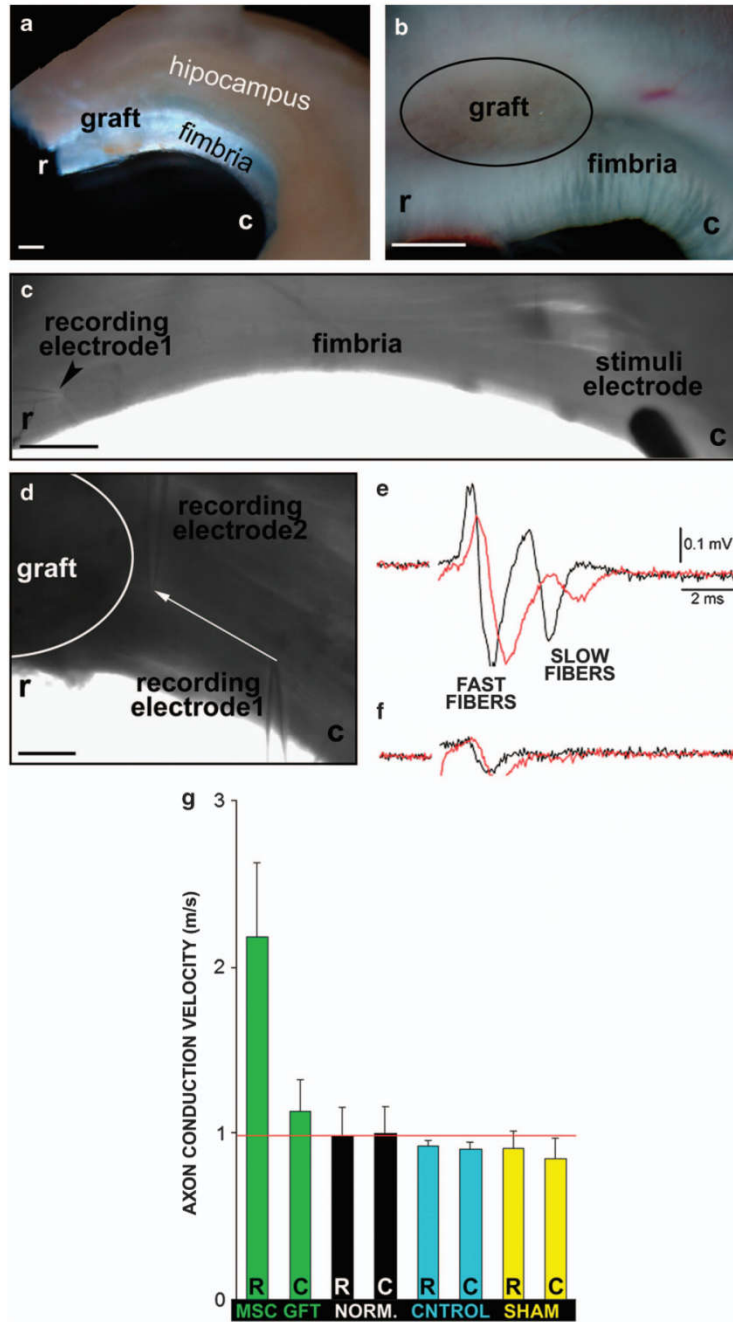


Figure 3 Axon conduction velocity in various regions of the fimbria. (a and b) Images of the extracted fimbria, depicting the location of the graft. (c) The stimulus electrode located in the caudal region (c) of the fimbria and a registry electrode in the rostral area (caudal to the graft) (r). (d) Details of the position of the two registry electrodes to obtain the recordings of the caudal fibers around the graft (white line). (e and f) Two fibers were detected: fast (thicker myelin sheaths) and slow (thin and/or non-myelin sheaths) fibers. (g) Histogram depicting the axon potential velocities in the fast fibers measured in the MSC (green), normal non-demyelinated (black), sham-operated (yellow) and control demyelinated fimbria (blue) in the rostral (R) or caudal (C) regions. Red line denotes wild-type values. Scale bar, 1 mm (a and b); 500 μ m (c); and 100 μ m (d)

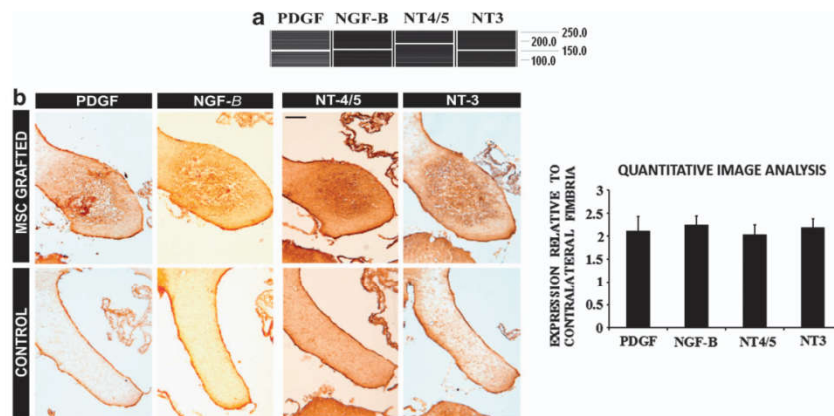


Figure 4 Trophic factor expression after grafting. (a) PCR analysis of cultured mesenchymal stromal cells. (b) Immunohistochemical analysis of the stem cell-treated fimbria for the expression of various trophic factors compared with the control fimbria. NT4/5, NT3, PDGF and NGF- β were expressed in MSC-grafted fimbria. The histogram to the right depicts the quantification of the immunoreactivity of the trophic factors analyzed by immunohistochemistry, relative to the contralateral (non-treated) side of the fimbria. A value over 1 indicates a higher immunoreactivity in the treated side of the fimbria compared with the non-treated side. Scale bar, 50 μ m

circumstances, two fiber types can be detected: fast and slow fibers, corresponding to axons with thick and thin myelin sheaths, respectively. Interestingly, in our model after demyelination the conduction velocities of both fast and slow fibers were not severely affected compared with normal values. This was possibly due to the spontaneous compensatory mechanisms in the axon, such as axonal dilatation that increases axonal diameter. In the MSC-treated group, the conduction velocity of the fast fibers doubled with respect to the other groups, including wild-type controls. Also, when the rostro-medial area of the fimbria was registered, close to the fornix, we observed a very significant increase in the conduction velocity, possibly due to the proximity of OPC migratory routes deriving from the neurogenic niches. In this area a large concentration of OPCs was observed. This strong increase of impulse transmission could be due to the remyelination of dilated axons, which could restore saltatory conduction in already dilated axons.

In conclusion, MSC transplantation resulted in the activation of nearby oligodendrocyte progenitors, which because of the cuprizone treatment maintained an unactivated state. In turn, these OPCs matured into myelinating oligodendrocytes. This was due to the secretion of several trophic factors, which also activated the neurogenic niches, provoking the migration of OPCs from the subventricular zone and DG of the hippocampus toward the graft. These results indicate a possible stem cell-based therapy where mesenchymal stem cells may be delivered into the CNS of MS in the chronic phase of the lesions.

Materials and Methods

Animals. All experiments have been performed in compliance with the Spanish and European Union laws on animal care in experimentation (Council Directive 86/609/EEC) and have been analyzed and approved by the Animal Experimentation Committee of our University. Green fluorescent protein (GFP) (C57Bl/6-Tg(ACTB-EGFP)10sb/J) transgenic mice were used as donors, whereas C3H/He (H2K^b) mice were used as hosts. Both animal strains were bred and maintained in our animal facilities.

Demyelinating treatment. Four-week old C3H/He mice were given a diet with 0.2% cuprizone (w/w) for 12 weeks *ad libitum* in order to obtain a chronic version of toxicity-induced demyelination, as previously indicated,³⁹ but with the following changes. Finely powdered cuprizone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in 60% tap water (w/v) with 0.5% (w/v) commercialized cane sugar. The cane sugar was added to avoid the weight loss observed in other studies because of the cuprizone treatment. After 12 weeks, the mice were grafted with MSCs (or culture medium in the case of sham-operated group) and returned to normal diet until their death, which was depending on the test at 15 or 90 days (see timeline in Figure 1a).

Isolation and culture of MSCs. The isolation and culture of MSCs was performed as in our previous studies.^{40,41} Briefly, the bone marrows of transgenic GFP mice were extracted, disaggregated and cultured in plastic flasks. The following culture medium was used: high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK), 15% fetal bovine serum (Biocrom AG, Berlin, Germany) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich). The stem cells were maintained for 3–4 weeks (passages 2–3) before proceeding to the surgical interventions.

Cell transplantation and experimental groups. A total of 24 mice were injected with MSCs ($n=10$ for immunohistochemistry, $n=8$ for electrophysiology and $n=6$ for electron microscopy). Also, for the sham-operated group, another 10 animals were used ($n=4$ for immunohistochemistry, $n=3$ for electrophysiology and $n=3$ for electron microscopy). In both groups, before performing the surgical procedure, 0.1 mg/kg of buprenorphine (Buprex, Schering-Plough, Madrid, Spain) was injected into the mice. Isoflurane (Esteve Veterinary, Milan, Italy), an inhalational anesthesia, was used, and the mice was placed on a stereotaxic apparatus (Stoelting, Wheat Lane Wood Dale, IN, USA). The animal was monitored, and anesthesia concentration was controlled. The injections were performed in the right fimbria at the following stereotaxic coordinates (Kopf, model 900 small animal stereotaxic instrument; anteroposterior relative to bregma, mediolateral and dorsoventral from the surface of the brain): -0.11 , -0.16 and -0.26 mm, respectively. The MSCs were injected using a 5 μ l Hamilton syringe (Reno, NV, USA) coupled with a DMEM-rinsed siliconed-capillary glass. In the MSC-operated group, 300 000 cells were transplanted in 2 μ l of DMEM. The left fimbria was considered as the internal control of demyelination for all experimental groups and in all studies except in electron microscopy, where the side of the graft was randomized. After the injection, the incision was sutured and the mice were monitored throughout the whole process of experimentation. For the immunohistochemical analysis, the mice were killed at 15 days after the surgical intervention. As for the remaining tests (quantitative PCR, electrophysiology and electron microscopy), the mice were killed 3 months after the intervention.

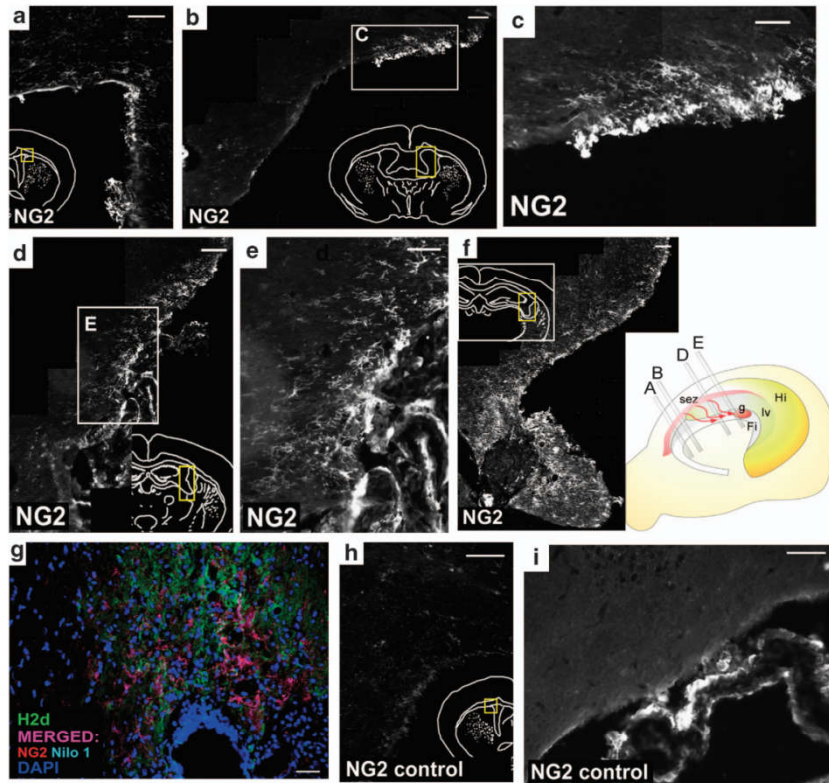


Figure 5 Analysis of the neurogenic niches: subventricular zone. (a–f) Coronal sections of the LV showing NG2 + cells migrating from the subventricular zone to the MSC-grafted fimbria. NG2 + cells, corresponding to OPCs, migrate rostro-caudally from the subventricular zone in the side of the fimbria where the stem cells were injected (a). The cells migrated bordering the lateral ventricular until they reached the fimbria (b–f). (b) Immunohistochemical image depicting the NG2 + cells bordering the LV. (c) Close-up of inset in b, where the cells can be seen with a migratory morphology. (d) NG2 + cells entering the fimbria. (e) Close-up of the inset in d. (f) NG2 + cells surrounding the stem cell graft. The scheme to the right shows the spatial distribution of the images observed in a–f. g, graft; Fi, fimbria; lv, lateral ventricle; Hi, hippocampus. (g) Immunohistochemical analysis of the migrating NG2 +/Nilo1 + cells. In the image, H2d is in green (Alexa Fluor 488), NG2 in red (Texas Red), Nilo1 is light blue (aminomethyl coumarin acetate) and 4',6-diamidino-2-phenylindole in dark blue. Double-positive NG2 and Nilo1 cells are detected in purple. (h–i) The contralateral side of the fimbria, where no cells were injected, did not present the migrating cells observed in the treated side. Scale bar, 100 μ m (c and h); 75 μ m (e); 50 μ m (a, b, d, f and i); and 25 μ m (g)

Immunofluorescence technique. To fixate the brain tissue, the mice were anesthetized using isoflurane and perfused intracardially 4% filtered paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer (PB; pH 7.4). The brain was carefully excised and kept in 4% PFA overnight. After fixation, the samples were cryoprotected for 12 h at 4 °C in 15% sucrose, followed by incubation overnight in 30% sucrose. Finally, samples were embedded in Neg-50 Frozen Section Medium (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA). Twelve micrometer transverse or longitudinal serial sections were obtained using a Microm HM525 cryostat and mounted on seven parallel series and processed for immunohistochemistry (Microm, Walldorf, Germany). Double-labeled immunohistochemistry was performed using the following primary antibodies: rabbit anti-NG2 (1:150; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), mouse anti-MBP (1:100; Oncogene Research Products, La Jolla, CA, USA), rat anti-proteolipid protein (AA3-PLP) (1:50; Millipore, Billerica, MA, USA), sheep anti-NT3 (1:200; Abcam, Cambridge, UK), sheep anti-NT4/5 (1:200; Chemicon, Millipore, Oxford, UK), sheep anti-NGF- β (1:500; Chemicon), goat anti-platelet-derived growth factor (PDGF) (1:200; Santa Cruz Biotechnology), hamster anti-Nilo1²⁰, mouse anti-H2D^p haplotype (1:100; BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), mouse monoclonal anti-GFP (1:200, Molecular Probes, Grand Island, NY, USA) and rabbit polyclonal anti-GFP (1:500, Molecular Probes). Even though the grafted stem cells express GFP, immunostaining was performed on this protein in order to amplify the signal,

facilitating its observation. As secondary antibodies, for GFP we used anti-mouse or anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:500; Molecular Probes). In the rest of cases, either Alexa Fluor 594 (1:500; Molecular Probes) or biotinylated secondary antibodies were used (1:200; Vector Laboratories, Peterborough, UK) followed by an incubation with streptavidin conjugated with Texas Red or aminomethyl coumarin acetate (1:500; Vector Laboratories). 4',6-Diamidino-2-phenylindole (2 μ g/ml; Molecular Probes) was used to stain nuclei. For the expression of NT3, NT4/5, NGF- β and PDGF, immunostaining with 3,3'-diaminobenzidine (Applchem, Darmstadt, Germany) was performed. Controls of immunostaining were performed in two slides of each sample following the same procedure, but eliminating primary or secondary antibodies. Histological samples were observed under a fluorescence microscope (Leica DM6000D; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Micrographs were taken with DFC350/FX and DC500 Leica cameras.

Electrophysiological experiments. The recordings were performed in a preparation of the fimbria–hippocampus *in vitro* prepared from non-treated, MSC-injected and sham groups, as well as their internal controls. The animals were killed by cervical dislocation at 3 months after grafting or the equivalent age for sham-treated and controls, and the fimbria–hippocampus complex was dissected and placed in a submersion type recording chamber and superfused with extracellular solution (composition in mM: NaCl, 124; KCl, 2.5; NaH₂PO₄, 1.25;

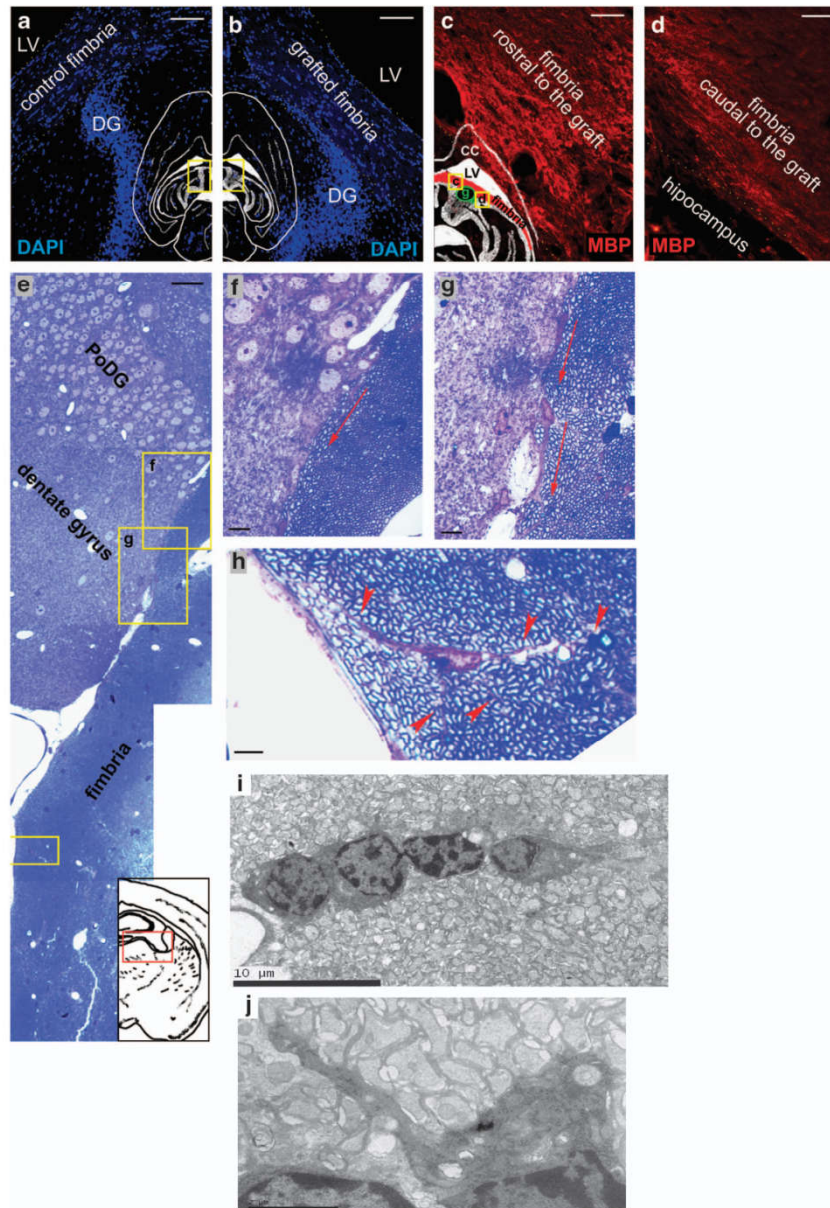


Figure 6 Analysis of neurogenic niches: DG. (a and b) Horizontal sections of the contralateral (non-treated) and MSC-grafted side of the fimbria, respectively, showing the tight location of the DG and fimbria, delimited by yellow-dotted lines. Blue is 4',6-diamidino-2-phenylindole staining. (c and d) MBP staining, in red, of the rostral (c) (see 'r' yellow line in the localization scheme) and caudal (d) regions (see 'c' yellow line in the localization scheme) to the graft (see 'g' green line in the localization scheme), showing that the area closest to the DG expresses more MBP. (e) Reconstructed semi-thin ultramicrotome sagittal section showing cells migrating from the DG to the fimbria. (f–h) High magnifications of insets in e. Red arrows in f and g indicate cell polarity according to a possible cell migration from the DG. Red arrowheads in h indicates cytoplasmic prolongations from an oligodendrocyte ensheathing various axons. (i and j) Oligodendrocyte precursors migrating toward the graft, as observed by electron microscopy. Scale bar, 100 μm (a and b); 50 μm (c–e); 10 μm (f and g); and 5 μm (h)

NaHCO₃, 26; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; glucose, 10; and osmolarity 300 mOsm/kg (pH 7.4), when saturated with 5% CO₂ + 95% O₂). The recordings were obtained at room temperature (24.3–26.3 °C). The fimbria was stimulated at the caudo-lateral end with a concentric bipolar electrode (Frederick Haer & Co, Bowdoin, ME, USA)

using pulses of 0.1 ms of duration. Two simultaneous extracellular recordings were obtained with glass pipettes (0.2–5 M Ω) filled with extracellular solution; the two electrodes were placed in parallel with the fimbria axons in different places with respect to the graft. In the grafted fimbria, the graft was identified because of its

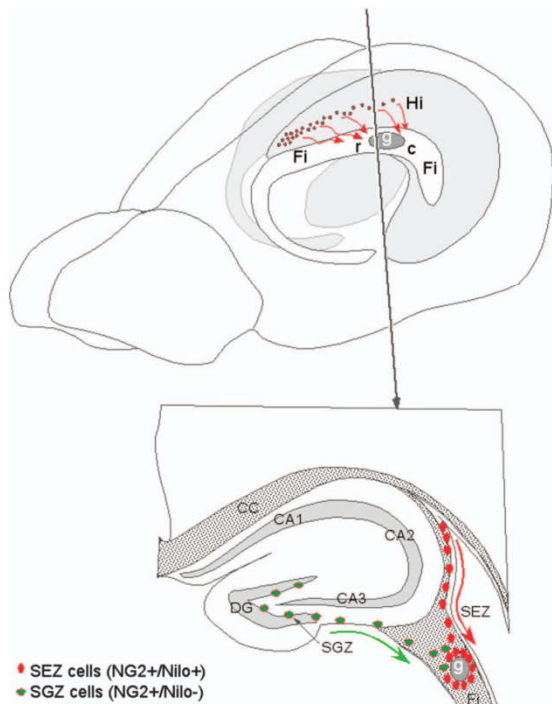


Figure 7 Schematic review of bone marrow-derived MSC-induced remyelination. In the top image, the stem cells (labeled G) were grafted into the fimbria (Fi), attracting oligodendrocyte progenitors from the hippocampus (Hi). R is rostral and C is caudal. The bottom image depicts a scheme representing the migration of oligodendrocyte progenitors from the two neurogenic niches: the SEZ (red circles) and subgranular zone (SGZ) of the DG (green circles)

native GFP staining, whereas in the sham-operated group the injection site could be detected because of the visible slight scar. The two recording electrodes were placed in four zones located rostro-medial, caudo-lateral, parallel and inside, with respect to the graft (in MSC group); in the sham group or internal control group, we used equivalent recording positions. The conduction velocity was measured from the distance between the tips of both electrodes and the difference in the latency of the propagated action potential.

Transmission electron microscopy (TEM) studies. For TEM, the mice were perfused with 2% PFA /1.5% glutaraldehyde in PB 0.12 M with Cl_2Ca . Brains were post-fixed in the same fixative overnight at 4 °C, and fimbria was dissected and washed for 12 h in PB 0.1 M (pH 7.4) with 7% sucrose. Afterwards, the fimbria were post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.2 M cacodylate buffer, rinsed and stained with 2.5% uranyl acetate in Michaelis buffer. Samples were dehydrated with acetone and propylene oxide and embedded in EPON. Thick sections (1 μ m) were obtained rostro-medially, caudo-laterally and at the level of the graft. Ultra-thin electron microscope images were observed by the EM department in the University of Murcia, Spain.

Quantification of immunoreactivity in the fimbria. The quantification of GFAP, MBP and NG2 immunoreactivity in the fimbria was performed using imaging analysis software (ImageJ). To do so, one image was taken of the whole fimbria per serial section (one out of every seven consecutive sections) and changed to an 8-bit image (becoming a black and white image). Then, the fimbria was delimited and the percentage of illuminated pixels (white pixels) was calculated, following the instructions published in Hartig.⁴² Finally, the average and S.D. of the seven percentages were calculated. This was performed both in the sham-operated and stem cell-treated groups and compared. In the case of the

expression of the trophic factors analyzed in the fimbria, these were quantified in a similar fashion, only that they were normalized to the contralateral (non-treated) side of the fimbria. In this manner, a value over 1 indicated that the treated side presented higher immunoreactivity compared with the non-treated side.

PCR analysis. Cultured MSCs were analyzed for gene expression of neurotrophic factors NT3, NT4/5, PDGF and NGF- β . Total RNA was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) and DNase I treatment to avoid genomic contamination. Reverse Transcription was performed using the Quantitect Reverse Transcription kit (Qiagen) and processed using the Qiagen Multiplex PCR kit. The sequences of the primers used were: NT3 forward 5'-AGTTTGCCGGAAGACTCTCTC-3', reverse 5'-GGGTGCTCTGGTAATTTTCCTTA-3'; NT4/5 forward 5'-TGAGCTGGCATATGCGAC, reverse 5'-CAGCGCGTCTCGAAGAAGT-3'; PDGF forward 5'-GCAAGACCAGGACGGTCATTT, reverse 5'-GGCAGCTTGACACTGCTCGT-3'; and NGF- β forward 5'-GCACACACCATCAAGTTCA-3', reverse 5'-TCCTGAGTCATGCTCACAAAGT-3'. The resulting PCR products were placed in a QIAxcel apparatus (Qiagen) and analyzed using the QIAxcel gel analysis software (QIAxcel Biocalculator).

Statistical analysis. Student's *t*-test for independent samples was used to detect significant differences between sham and MSC-grafted or MSC-grafted and control fimbria for each case, using IBM SPSS Statistic v19.0.0 software (Armonk, NY, USA).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. This work was supported by MINISTERIO CIENCIA E INNOVACION (MICINN BFU2010-27326), DIGESIC-MEC BFU2008-00588, Ingenio 2010 MEC-CONSOLIDER CSD2007-00023, from the GVA Prometeo grant 2009/028 and ISCIII Cibersam and Terceol (RD06/0010/0023), as well as ELA Foundation, Fundación Diogenes-Elche city government and Rotary Club Elche-Illice and Fundació Gent per Gent grant 24 NEURO.

- Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 1996; **85**: 299–302.
- Aktas O, Kieseier B, Hartung HP. Neuroprotection, regeneration and immunomodulation: broadening the therapeutic repertoire in multiple sclerosis. *Trends Neurosci* 2010; **33**: 140–152.
- Kohler W. Leukodystrophies with late disease onset: an update. *Curr Opin Neurol* 2010; **23**: 234–241.
- Nave KA. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 2010; **468**: 244–252.
- Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2009; **10**: 9–22.
- Sellers DL, Maris DO, Horner PJ. Postinjury niches induce temporal shifts in progenitor fates to direct lesion repair after spinal cord injury. *J Neurosci* 2009; **29**: 6722–6733.
- Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yachine C. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 2006; **26**: 7907–7918.
- Chari DM, Crang AJ, Blakemore WF. Decline in rate of colonization of oligodendrocyte progenitor cell (OPC)-depleted tissue by adult OPCs with age. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; **62**: 908–916.
- Chari DM, Huang WL, Blakemore WF. Dysfunctional oligodendrocyte progenitor cell (OPC) populations may inhibit repopulation of OPC depleted tissue. *J Neurosci Res* 2003; **73**: 787–793.
- Chari DM. Remyelination in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 2007; **79**: 589–620.
- Williams A, Piaton G, Agrot MS, Belhadi A, Théaudin M, Petermann F *et al*. Semaphorin 3A and 3F: key players in myelin repair in multiple sclerosis? *Brain* 2007; **130**: 2554–2565.
- Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J, Bruck W. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain* 2008; **131**: 1749–1758.
- Rivera FJ, Steffenhagen C, Kremer D, Kandasamy M, Sandner B, Couillard-Despres S *et al*. Deciphering the oligodendrogenic program of neural progenitors: cell intrinsic and extrinsic regulators. *Stem Cells Dev* 2010; **19**: 595–606.
- Zhang J, Li Y, Chen J, Cui Y, Lu M, Elias SB *et al*. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Exp Neurol* 2005; **195**: 16–26.
- Zhang J, Li Y, Lu M, Cui Y, Chen J, Noffsinger L *et al*. Bone marrow stromal cells reduce axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J Neurosci Res* 2006; **84**: 587–595.
- Cristofanilli M, Harris VK, Zigelbaum A, Goossens AM, Lu A, Rosenthal H *et al*. Mesenchymal stem cells enhance the engraftment and myelinating ability of allogeneic oligodendrocyte progenitors in dysmyelinated mice. *Stem Cells Dev* 2011; **20**: 2065–2076.

17. Rivera FJ, Kandasamy M, Couillard-Despres S, Caioni M, Sanchez R, Huber C *et al*. Oligodendrogenesis of adult neural progenitors: differential effects of ciliary neurotrophic factor and mesenchymal stem cell derived factors. *J Neurochem* 2008; **107**: 832–843.
18. Steffenhagen C, Dechant FX, Oberbauer E, Furtner T, Weidner N, Kürty P *et al*. Mesenchymal stem cells prime proliferating adult neural progenitors toward an oligodendrocyte fate. *Stem Cell Dev* 2012; **21**: 1838–1851.
19. Kumar S, Biancotti JC, Yamaguchi M, de Vellis J. Combination of growth factors enhances remyelination in a cuprizone-induced demyelination mouse model. *Neurochem Res* 2007; **32**: 783–797.
20. Del Valle I, Eivira G, Garcia-Benazquen L. Characterization of novel monoclonal antibodies able to identify neurogenic niches and arrest neurosphere proliferation and differentiation. *Neuroscience* 2010; **169**: 1473–1485.
21. Sim FJ, Zhao C, Penderis J, Franklin RJ. The age-related decrease in CNS remyelination efficiency is attributable to an impairment of both oligodendrocyte progenitor recruitment and differentiation. *J Neurosci* 2002; **22**: 2451–2459.
22. Armstrong RC, Le TQ, Flint NC, Vana AC, Zhou YX. Endogenous cell repair of chronic demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; **65**: 245–256.
23. Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB. Interaction between NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells is required for optimal response to PDGF. *J Neurosci Res* 1996; **43**: 315–330.
24. McKinnon RD, Matsui T, Aranda M, Dubois-Dalcq M. A role for fibroblast growth factor in oligodendrocyte development. *Ann NY Acad Sci* 1991; **638**: 378–386.
25. Barres BA, Raff MC, Gaese F, Bartke I, Dechant G, Barde YA. A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development. *Nature* 1994; **367**: 371–375.
26. Ye P, D'Ercole AJ. Insulin-like growth factor I protects oligodendrocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced injury. *Endocrinology* 1999; **140**: 3063–3072.
27. Barres BA, Schmid R, Sendtner M, Raff MC. Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development* 1993; **118**: 283–295.
28. Jiang F, Frederick TJ, Wood TL. IGF-I synergizes with FGF-2 to stimulate oligodendrocyte progenitor entry into the cell cycle. *Dev Biol* 2001; **232**: 414–423.
29. Wolswijk G, Noble M. Cooperation between PDGF and FGF converts slowly dividing O-2A adult progenitor cells to rapidly dividing cells with characteristics of O-2A perinatal progenitor cells. *J Cell Biol* 1992; **118**: 889–900.
30. Boyd JG, Gordon T. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci* 2002; **15**: 613–626.
31. Beck M, Flachenecker P, Magnus T, Giess R, Reiners K, Toyka KV *et al*. Autonomic dysfunction in ALS: a preliminary study on the effects of intrathecal BDNF. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2005; **6**: 100–103.
32. Eriksdotter-Jönhagen M, Nordberg A, Amberla K, Bäckman L, Ebendal T, Meyerson B *et al*. Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1998; **9**: 246–257.
33. Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER Jr. *et al*. Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* 2003; **60**: 69–73.
34. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; **98**: 1076–1084.
35. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 2006; **36**: 2566–2573.
36. Rivera FJ, Siebzehnrubl FA, Kandasamy M, Couillard-Despres S, Caioni M, Poehler AM *et al*. Mesenchymal stem cells promote oligodendroglial differentiation in hippocampal slice cultures. *Cell Physiol Biochem* 2009; **24**: 317–324.
37. Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci* 2001; **24**: 39–47.
38. Franklin RJ. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci* 2002; **3**: 705–714.
39. Nishiyama A, Yang Z, Butt A. Astrocytes and NG2-glia: what's in a name? *J Anat* 2005; **207**: 687–693.
40. Jones J, Jaramillo-Merchán J, Bueno C, Pastor D, Viso-Leon MC, Martínez S. Mesenchymal stem cells rescue Purkinje cells and improve motor functions in a mouse model of cerebellar ataxia. *Neurobiol Dis* 2010; **40**: 415–423.
41. Pastor D, Viso-Leon MC, Jones J, Jaramillo-Merchán J, Toledo-Aral JJ, Moreda JM *et al*. Comparative effects between bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation in GDNF Expression and motor function recovery in a motoneuron degenerative mouse model. *Stem Cell Rev Rep* 2012; **8**: 445–458.
42. Hartig SM. Basic image analysis and manipulation in ImageJ. *Curr Protoc Mol Biol* 2013 Chapter 14: Unit 14.15; 1-14.



Cell Death and Disease is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>



FGF8 Activates Proliferation and Migration in Mouse Post-Natal Oligodendrocyte Progenitor Cells

Pablo Cruz-Martinez¹, Almudena Martinez-Ferre¹, Jesus Jaramillo-Merchán¹, Alicia Estirado¹, Salvador Martinez^{1,2}, Jonathan Jones^{1*}

¹ Neuroscience Institute, University Miguel Hernández (UMH-CSIC), San Juan, Alicante, Spain, ² IMIB-Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Universidad de Murcia, Murcia, Spain

Abstract

Fibroblast growth factor 8 (FGF8) is a key molecular signal that is necessary for early embryonic development of the central nervous system, quickly disappearing past this point. It is known to be one of the primary morphogenetic signals required for cell fate and survival processes in structures such as the cerebellum, telencephalic and isthmic organizers, while its absence causes severe abnormalities in the nervous system and the embryo usually dies in early stages of development. In this work, we have observed a new possible therapeutic role for this factor in demyelinating disorders, such as leukodystrophy or multiple sclerosis. In vitro, oligodendrocyte progenitor cells were cultured with differentiating medium and in the presence of FGF8. Differentiation and proliferation studies were performed by immunocytochemistry and PCR. Also, migration studies were performed in matrigel cultures, where oligodendrocyte progenitor cells were placed at a certain distance of a FGF8-soaked heparin bead. The results showed that both migration and proliferation was induced by FGF8. Furthermore, a similar effect was observed in an in vivo demyelinating mouse model, where oligodendrocyte progenitor cells were observed migrating towards the FGF8-soaked heparin beads where they were grafted. In conclusion, the results shown here demonstrate that FGF8 is a novel factor to induce oligodendrocyte progenitor cell activation, migration and proliferation in vitro, which can be extrapolated in vivo in demyelinated animal models.

Citation: Cruz-Martinez P, Martinez-Ferre A, Jaramillo-Merchán J, Estirado A, Martinez S, et al. (2014) FGF8 Activates Proliferation and Migration in Mouse Post-Natal Oligodendrocyte Progenitor Cells. PLoS ONE 9(9): e108241. doi:10.1371/journal.pone.0108241

Editor: Fernando de Castro, Hospital Nacional de Paraplégicos - SESCAM, Spain

Received: April 11, 2014; **Accepted:** August 26, 2014; **Published:** September 26, 2014

Copyright: © 2014 Cruz-Martinez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

Funding: This work has been funded by MAPFRE Foundation, FARA/FARA Ireland (Friedreich's Ataxia Research Alliance), ASOGAF (Friedreich's Ataxia association of Granada), Science and Innovation Ministry (MICINN BFU2010-27326), GVA Prometeo grant 2009/028 and PrometeoII grant 2014/014, Tercele (RD06/0010/0023 & RD06/0010/24), MEC-CONSOLIDER CSD2007-00023, Cinco P menos Foundation, EUComm, Fundación Diogenes-Elche city government, and Walk on Project. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: jon@umh.es

Introduction

Oligodendrocyte degeneration and subsequent myelin loss is the primary cause of multiple sclerosis and leukodystrophy, among other demyelinating conditions. This may be due to either an autoimmune attack (multiple sclerosis) or metabolic/genetic defects (leukodystrophy) [1–3]. Myelin loss causes irreversible neurological deficits, as the oligodendrocytes are crucial both for the metabolic support of the axons [4] as well as the correct transmission of the nerve impulse. Thus, oligodendrocyte loss implicates neuronal degeneration.

Oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) are located throughout the central nervous system, which can be detected by the expression of the proteoglycan NG2 [5,6]. These cells, after an acute demyelinating lesion, are activated and differentiate into mature oligodendrocytes as early as 7 days after the injury [7]. Depending on the type of demyelinating lesions, multiple sclerosis is divided into two phases: acute and chronic. In the acute phase, the nearby OPCs invade the lesion and remyelinate [8,9], while in the chronic phase the migratory and differentiating mechanisms of the progenitors are affected, resulting in sustained and progressive demyelination [10]. This latter phase is partly due to the lack of factors that stimulate regeneration and/or to the presence in the

lesion of molecules that inhibit remyelination [11]. In this case, the stimulation of OPCs to migrate and differentiate by external sources is a viable therapeutic option in order to favor neuronal survival [12].

Previous works in our lab have proven that OPCs may be activated and remyelination induced using bone marrow stem cells [13]. This was due to the secretion of certain soluble factors. In this work, we analyzed the effect that fibroblast growth factor 8 (FGF8) may exert on the activation and differentiation of OPCs. Fibroblast growth factors (FGFs) are a family of soluble protein ligands that play numerous roles during embryonic development, tissue homeostasis and metabolism. There are 22 known members, with different receptor binding affinities and biological functions [14–16]. Depending on the type and receptor, FGFs activate the RAS-MAPK or PI3K-AKT pathway, promoting proliferation, survival and/or motility in various cell types, including oligodendrocytes [17–23].

Of the FGFs members, FGF8 is known to be implicated in early vertebrate brain patterning, and its inhibition causes early embryonic death with absence of the entire mesencephalic and cerebellar primordia [24–28], as well as important thalamic and telencephalic malformations [29,30]. FGF8 is capable of binding to all 4 FGF

receptors, with different affinities among them [31,32]. When the growth factor binds to its receptor, phosphorylation of the Extracellular signal Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) usually occurs, activating the RAS-MAPK intracellular pathway [33–36].

The aim of this study is to analyze if FGF8 may exert an effect on post-natal OPCs, both *in vitro* and *in vivo*. As this factor is a known morphogen during embryonic development, the rationale is that FGF8 may be used to induce the mobilization, proliferation, and differentiation of OPCs, as well as possibly remyelination. The results of this work may indicate a possible use for this morphogen in therapies to induce remyelination such as in multiple sclerosis.

Materials and Methods

1 Animal experimentation

All the experiments with animals have been performed in compliance with the Spanish and European Union laws on animal care in experimentation (Council Directive 86/609/EEC), and have been analyzed and approved by the Animal Experimentation Committee of the University Miguel Hernandez and Neuroscience Institute, Alicante, Spain (Reference IN-SM-001-12). All efforts were made to minimize suffering. Mice were bred and maintained in our animal facilities.

2 Oligodendrocyte progenitor cell isolation and culture

The protocol used is similar to previous publications [37–39]. Briefly, the forebrains of newborn mice were removed, diced into 1 mm fragments, digested at 37°C for 20 min with a collagenase (1 mg/ml)/dispase (3 mg/ml) solution and mechanically dissociated. The resulting cellular suspension was then placed on poly-L-lysine coated dishes with the following culture medium: DMEM, 15% FBS, 1% penicillin/streptomycin. After 7–10 days, the culture consisted mainly in astrocytes with a small number of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) growing on top. In order to purify the culture, the cells were trypsinized with 0.05% trypsin and shaken to separate the OPCs from the astrocytes. Cell suspensions were then plated onto uncoated Petri dishes for 1 h to further remove residual contaminating microglia/astrocytes. The cell suspension was then replated in DMEM with 15% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 10 ng/ml PDGF-AA and 10 ng/ml FGF2 for 7 days to stimulate the proliferation of OPCs. This resulted in a cell culture of mainly OPCs. Experiments were performed in triplicate (i.e. isolating OPCs from 3 different mice), and a total of 4 independent experiments were performed.

3 BrdU/Proliferation Analysis, Immunocytochemistry and Immunohistochemistry

A standard immunocytochemistry protocol was used. Twenty-four hours before fixing the cells, 1 µg/ml of BrdU was added to the culture to allow its incorporation. Primary antibodies used were anti-BrdU (1:200, Dakocytomation, Denmark), anti-NG2 (1:150, Chemicon), anti-PDGFR-α (1:200, Santa Cruz Biotechnology), anti-Olig2 (1:500, Santa Cruz Biotechnology), anti-O4 (1:1000, Chemicon), anti-MBP (1:100, Oncogene Research Products), and DAPI as nuclear staining. As for secondary antibodies, Alexa Green (1:500, Molecular Probes) was used to stain in green, while for red staining a biotinylated secondary antibody was used (1:200, Vector Laboratories, Birmingham, California) followed by an incubation with streptavidin conjugated with Cy3 (1:500). Samples were visualized and images taken with a Leica fluorescence microscope (Leica DMR, Leica Microsystems).

For immunohistochemical analysis of the *in vivo* experiments, the mice were anesthetized and perfused using 4% filtered paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer (pH 7.4). The brain

was carefully excised and kept in 4% PFA overnight. After fixation, the samples were cryoprotected for 12 hours at 4°C in 15% sucrose, followed by incubation overnight in 30% sucrose. Finally, samples were embedded in Neg -50 Frozen Section Medium (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, Michigan). Twelve micrometer transverse or longitudinal serial sections were obtained using a Microm HM525 cryostat and mounted on seven parallel series and processed for immunohistochemistry. Histological samples were observed under a fluorescence microscope (Leica DM6000D, Leica Microsystems). Micrographs were taken with DFC350/FX and DC500 Leica cameras.

4 Quantitative Real Time PCR

Total mRNA of the cells was isolated using the Trizol protocol (Invitrogen). A total of 5 micrograms of mRNA was reverse-transcribed, and approximately 100 ng of cDNA was amplified by Real Time PCR using Power SYBR Green Master mix (Applied Biosystems). All the samples were run in triplicate using the StepOne Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) and analyzed with the StepOne Software. Analyses were carried out using the delta C(T) method and calculated relative to GAPDH (forward: AGGT-CGGTGTGACGGATTTC, reverse: GGGGTCGGTTGATGG-CAACA). The results were normalized with respect to the control condition, which presented a value of 1, using the same approach as in our previous report [40]. The following primers were used: PDGFR-α (Forward: TCCATGCTAGACTCAGAAGTCA, Reverse: TCCCCGGTGGACACAATTTTC), NG2 (Forward: GGG-CTGTGCTGTCTGTTGA, Reverse: TGATTCCCTTCAGG-TAAGGCA), Olig2 (Forward: CTAATTCACATTCGGGAAG, Reverse: AAAAGATCATCGGGTTCT).

5 Matrigel Cultures

The method used was similar to that previously published [41]. A total of 20,000 oligodendrocyte progenitor cells were re-suspended in 5 µl of D-MEM and 20 µl of matrigel basement membrane matrix (BD Bioscience, 10 ml). D-MEM supplemented with 15% FBS was used as culture medium, as in the differentiation protocol of oligodendrocyte progenitor cells. The re-suspended cells were spread on a tissue culture dish (Becton Dickinson Labware), solidified during 25 min at 37°C and culture medium was added. Afterwards the cell-matrigel was cut in small squares of 125 µm² and put on a solidified matrigel drop. Heparin acrylic beads (Sigma) were first rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) four to six times and then soaked in FGF8 solution (5000 ng/ml; R&D) at 4°C overnight. The beads were then rinsed three times in PBS and put on the solidified matrigel drop 500 µm from the place where cells-matrigel was located. Control beads were soaked only in PBS and implanted in the same manner. FGF inhibitor (SU5402) was diluted in culture medium to a final concentration of 20 µM and soaked in Affigel blue beads (Bio-Rad), using the same procedure as described for FGF8-soaked beads. Then, 25 ml of a 1:1 matrigel:culture medium mix was added, covering the drop where cells and beads were placed. After 2 h at 37°C, culture medium was added. Finally, 24 h and 48 h afterwards, the migrating and/or non-migrating-cells were observed under a dissecting microscope.

To confirm an FGF8-mediated attracting effect, the proximal/distal rate was calculated in control and FGF8-embedded cultures. This was performed similar to a previous publication [42]. Briefly, the images of the cell clusters were analyzed by imaging software to draw a 45° arc from the cluster towards the beads. The number of cells counted inside this arc (proximal cells) was divided by the number of cells outside the arc (distal cells), obtaining a proximal/distal rate. Values greater or less than 1 indicated more or less cells, respectively, near the bead.

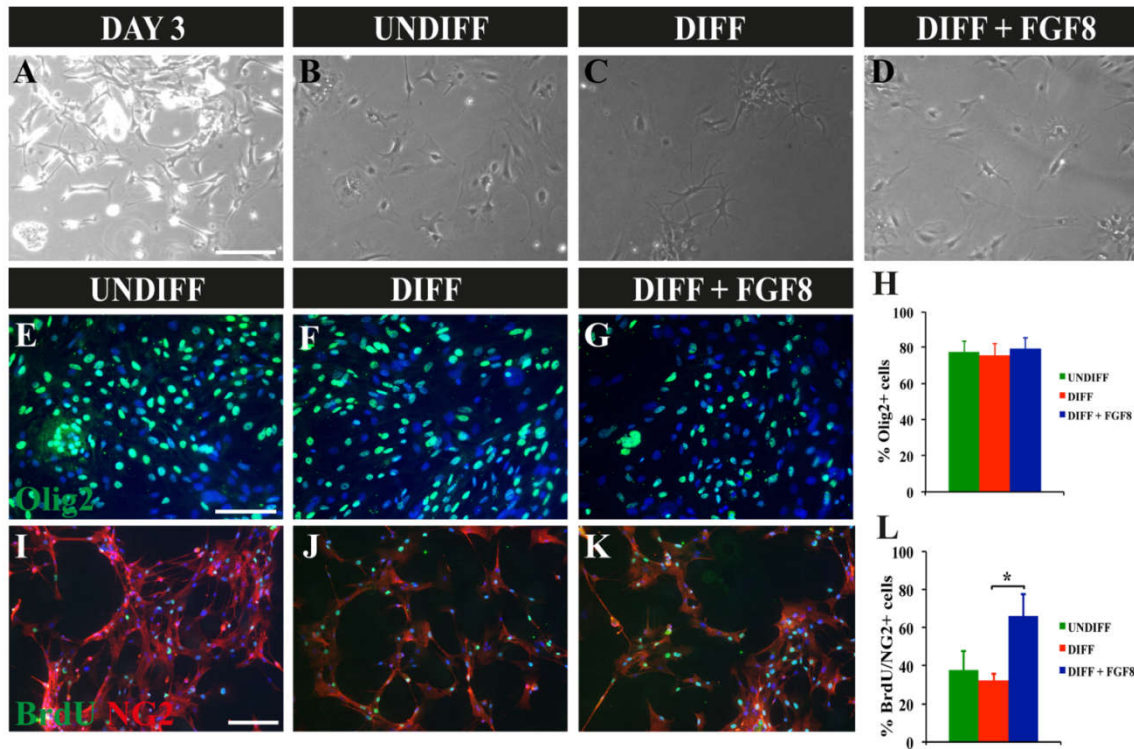


Figure 1. Culture and Differentiation of Oligodendrocyte Progenitor Cells (OPCs). A) OPCs cultured for 3 days after extraction on poly-L-lysine coated culture dishes. Numerous astrocytes are present. B) OPCs after passaging and expanding in the presence of FGF2 and PDGF-AA, to induce proliferation and maintenance of the OPCs. C) OPCs cultured in differentiation inducing medium for 7 days. Mature oligodendrocytes appear in the culture. D) OPCs cultured for 7 days in the differentiating medium and FGF8. All images taken at 100X magnification. E–G) Immunocytochemistry of OPCs in undifferentiating medium (E), differentiation inducing medium (F), and in the presence of FGF8 (G), staining for Olig2 (in green) and DAPI for nuclear staining (in blue). H) Histogram presenting the percentage of Olig2+ cells in the various cultures observed in E–G. Percentages are with respect to the total number of cells, calculated by DAPI staining. I–K) Immunocytochemistry of NG2+/BrdU+ cell in undifferentiating medium (I), differentiation inducing medium (J), and in the presence of FGF8 (K). L) Histogram presenting the percentage of NG2+/BrdU+ cells in the different cultures, with respect to the total number of cells. *p<0.05 (paired t-test), n=4. Scale Bar indicates 150 μm for A–D and 100 μm for E–G and I–K.
doi:10.1371/journal.pone.0108241.g001

6 Cuprizone Treatment of Mice as an In Vivo Chronic Demyelinating Model

The approach used was similar to our previously published report [13]. Briefly, Four-week old C3H/He mice were given a diet with 0.2% cuprizone (w/w) for 12 weeks ad libitum in order to obtain a chronic version of toxicity-induced demyelination, but with the following changes. Finely-powdered cuprizone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was dissolved in 60% tap water (w/v) with 0.5% (w/v) commercialized cane sugar. The cane sugar was added to avoid the weight loss observed in other studies due to the cuprizone treatment. After 12 weeks, the mice were grafted with the FGF8-soaked beads (or culture medium in the case of sham operated group) and returned to normal chow until their sacrifice.

7 FGF8-soaked heparin bead transplantation

The surgical procedure and coordinates used to inject the FGF8-heparin beads was the same as our previous report [13]. Before the surgical procedure, 0.1 mg/kg of buprenorphine (Buprex, Schering-Plough, Madrid, Spain) was injected into the mice. Isoflurane (Esteve Veterinary, Milan, Italy), an inhalational anesthesia, was used, and the mice were placed on a stereotaxic apparatus (Stoelting, Wheat

Lane Wood Dale, IN, USA). The animals were monitored, and anesthesia concentration controlled. After the injection, the incision was sutured and the mice were monitored throughout the whole process of experimentation. A total of 8 cuprizone-treated mice were operated, 4 with FGF8-embedded heparin beads (at 1 mg/ml) and 4 sham controls (where PBS-soaked beads were used). After 1 month, the mice were sacrificed.

To quantify NG2 and MBP immunoreactivity, a similar approach as published in [13] was used. Briefly, images were taken and changed to an 8-bit black and white image. Then, the percentage of illuminated pixels was calculated, and compared between the experimental groups.

8 Statistical Analysis

Statistical significance between control and experimental groups were calculated with Sigmaplot v12.0 software, using the paired t-test and one-way ANOVA test where applicable, establishing the level of significance at p<0.05. Values are measured as mean +/- standard deviation.

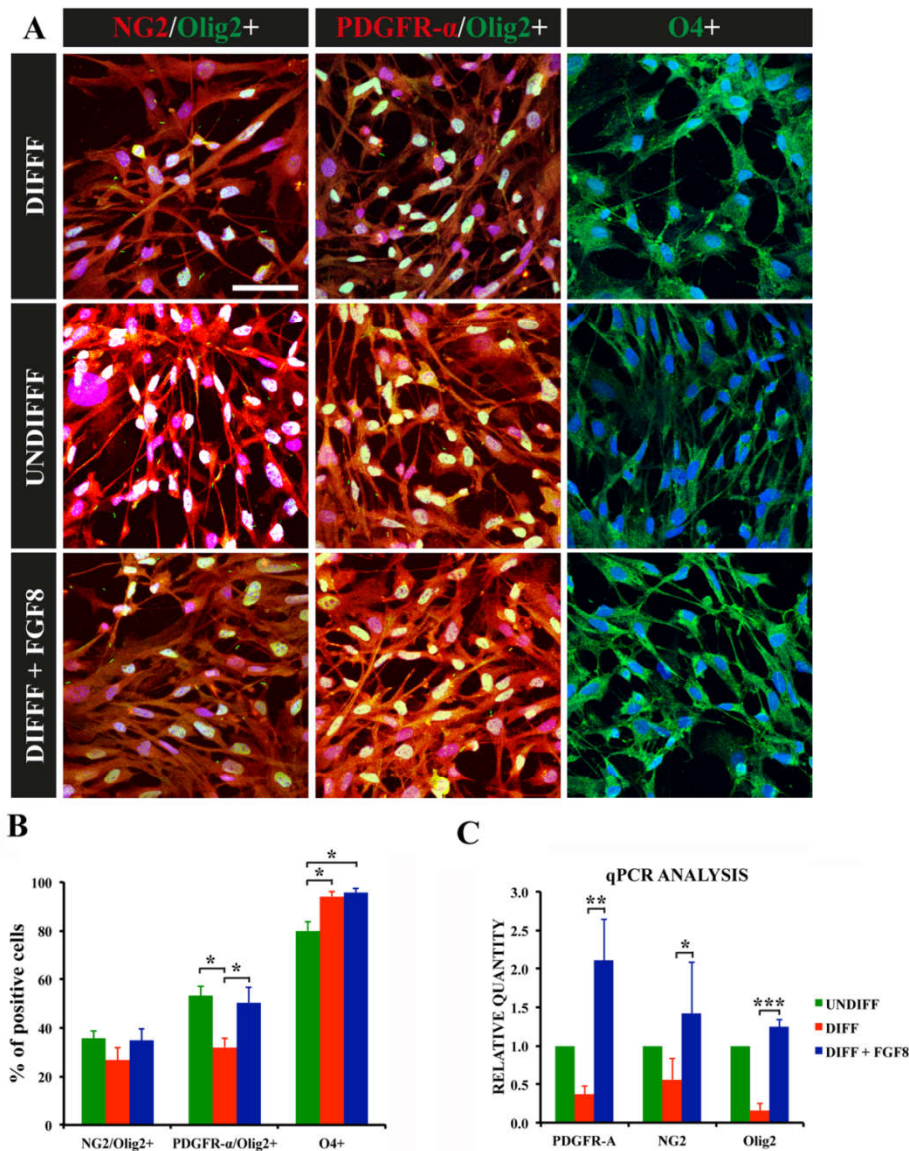


Figure 2. Oligodendrocyte progenitor cell differentiation with and without FGF8. A) Immunocytochemistry of NG2+/Olig2+, PDGFR-A+/Olig2+ and O4+ cells in the undifferentiated, differentiating and FGF8 culture media. In all images, blue staining corresponds to the nuclei (DAPI). Scale bar indicates 50 μm. B) Histogram depicting the percentage of cells in the different cell cultures staining for markers analyzed in A. Percentages are with respect to the total number of cells. C) Histogram depicting the results from the quantitative PCR analysis of the different cell cultures. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (paired t-test in B, one way-ANOVA in C), n=4. doi:10.1371/journal.pone.0108241.g002

Results

1 FGF8 Increases Proliferation in Cultured Oligodendrocyte Progenitor Cells (OPCs)

The OPCs were isolated from P0–P2 newborn mice and cultured on poly-L-lysine coated culture dishes. The initial culture was a mixture of astrocytes, OPCs and other cell types, the OPCs being mainly detected on top of the astrocytes (Figure 1A). After 7 days of culture, the cells were treated with trypsin and shaken in

order to detach the OPCs and re-plated onto new culture dishes, where they were further expanded using mitogens PDGF-AA and FGF2 (Figure 1B). In this fashion, after an additional 7 days of culture the majority of the cells detected corresponded to OPCs, as indicated in previous publications [35–37].

In order to induce OPCs differentiation, the culture medium was changed removing the mitogens and adding fetal bovine serum, resulting in spontaneous differentiation (Figure 1C). Mature oligodendrocytes could be detected after 7 days of culture, observed as

Oligodendrocyte Progenitor Proliferation by FGF8

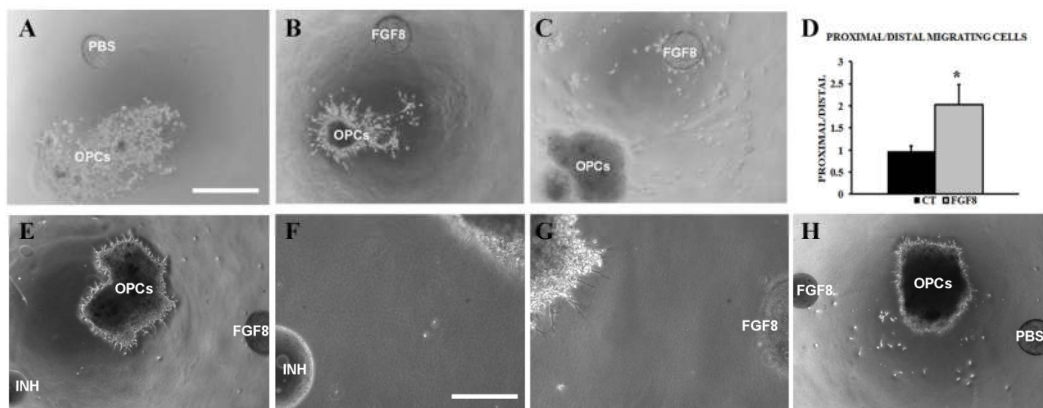


Figure 3. Matrigel cultures of OPCs. A) Oligodendrocyte progenitor cell matrigel culture where a PBS-soaked bead was placed 0.5 mm away from the cell cluster. Image taken at 40X magnification. B–C) OPCs where a cluster of cells migrating towards a FGF8-soaked bead can be observed. D) Histogram depicting the oligodendrocyte progenitor cell proximal/distal rate in control cultures and where FGF8 was included. * $p < 0.01$ (paired t-test, $n = 4$). (E–G) Matrigel cultures where on one side a FGF8-soaked bead was placed and on the other side a FGF8 inhibitor. (F, G) Close-up images of the areas near the inhibitor-soaked bead (F) or near the FGF8-soaked bead (G). H) OPCs where a FGF8-soaked bead was placed and on the other side a PBS-soaked bead, as control of the inhibitor. Scale bar indicates 500 μm for (A–C, D, H) and 200 μm for (F, G). All images were taken 48 hours after culture.

doi:10.1371/journal.pone.0108241.g003

cells with many small prolongations. In the experimental procedure with FGF8, this factor was added to the culture using the same differentiation medium (Figure 1D). Independently of the treatment, the cultures were mainly composed of oligodendrocytes, as analyzed by Olig2 staining (Figure 1E–H). In the cultures with FGF8, an increased number of cells were detected compared to the other treatments, despite performing the cultures with the same initial number of cells. To corroborate that FGF8 induced proliferation, BrdU was incorporated to the culture 24 hours before fixing, and then immunocytochemistry for BrdU and double-stained with NG2+ (an oligodendrocyte progenitor cell marker) to confirm that only oligodendrocytes were counted (Figure 1I–L). As a result, the oligodendrocyte progenitor cell cultures where FGF8 was added presented a marked increase in proliferation, even more so than in the undifferentiated cultures (Figure 1H). This confirmed that FGF8 induced the proliferation of OPCs.

2 FGF8 Upregulates the Expression of Early Oligodendrocyte Progenitor Cell Markers

As proliferation is enhanced, it is possible that differentiation may be hampered in turn. To confirm this, immature oligodendrocytic and oligodendrocyte progenitor cell markers NG2 and PDGFR- α , oligodendrocyte marker Olig2 and mature oligodendrocyte marker O4 were analyzed (Figure 2A). As a result, the percentage of cells positive for PDGFR- α and Olig2 was lower in the differentiated cultures, compared to the undifferentiated and FGF8 treatments (Figure 2B). As for O4, which begins to be expressed during oligodendrocyte maturation, coinciding with the loss of expression of NG2 and PDGFR- α [43], was increased in the differentiated and FGF8 treatments. This data was corroborated by QPCR (Figure 2C), indicating that the differentiated treatment resulted in less immature oligodendrocytes and OPCs, coinciding with more mature oligodendrocytes.

It is interesting to note that FGF8 treatment presented both more immature and mature markers. The composition of this culture medium was the same medium used for differentiation, except for the growth factor. Therefore, this data seems to indicate that FGF8 induces proliferation, resulting in more OPCs in

culture, and does not hamper differentiation, which in turn results in more mature oligodendrocytes in the culture.

3 FGF8 Induces the Migration of Oligodendrocyte Progenitor Cells

Undifferentiated OPCs were placed on matrigel cultures to perform migration assays. To this end, a heparin bead previously soaked in FGF8 solution (500 ng/ml) was placed 0.5 mm away from the cluster of OPCs, while a PBS-soaked bead was used as control (Figure 3A–C). Twenty four hours afterwards, outgrowths were observed from the OPCs, the majority of which were detected in the direction of the FGF8-soaked bead (Figure 3B). The cultures were maintained and observed after 48 and 72 hours, with similar results (Figure 3C), the OPCs reaching the heparin bead. To confirm the attracting effect of FGF8, proximal/distal analysis was performed on the cultures (Figure 3D). The cultures where FGF8-soaked beads were used presented a significantly higher proximal/distal ratio than control cultures where PBS was used. Specifically, a 2-fold increase in cells was detected near the beads than in distal areas of the cell clusters. Therefore, the results indicated a predominantly migrating, attracting effect induced by FGF8.

In order to confirm this migrating property, the FGF-receptor inhibitor SU5402 was used in the cultures to counteract the effect of FGF8 (Figure 3E–G). In this case, two beads were used, on one side of the cluster of OPCs, a FGF8-soaked bead was placed, while on the other end a bead soaked in the inhibitor. As control of the inhibitor a PBS-soaked bead was used (Figure 3H). As a result, after 48 hours of culture, in the side of the OPCs where the SU5402-soaked bead was placed, no cell sprouting or migration was detected (Figure 3F). In the other side of the cluster, nearest the FGF8-soaked bead, numerous cell outgrowths were present (Figure 3G), indicating that the OPCs were stimulated by the FGF8 but the inhibitor managed to halt further migration. In the cases where PBS was used instead of the inhibitor, migration of the OPCs was observed as in the previous results (Figure 3H).

Overall, the results demonstrated that FGF8 is capable of inducing oligodendrocyte progenitor cell migration, exerting and attracting effect, and is mediated by the binding of FGF8 to FGF receptors.

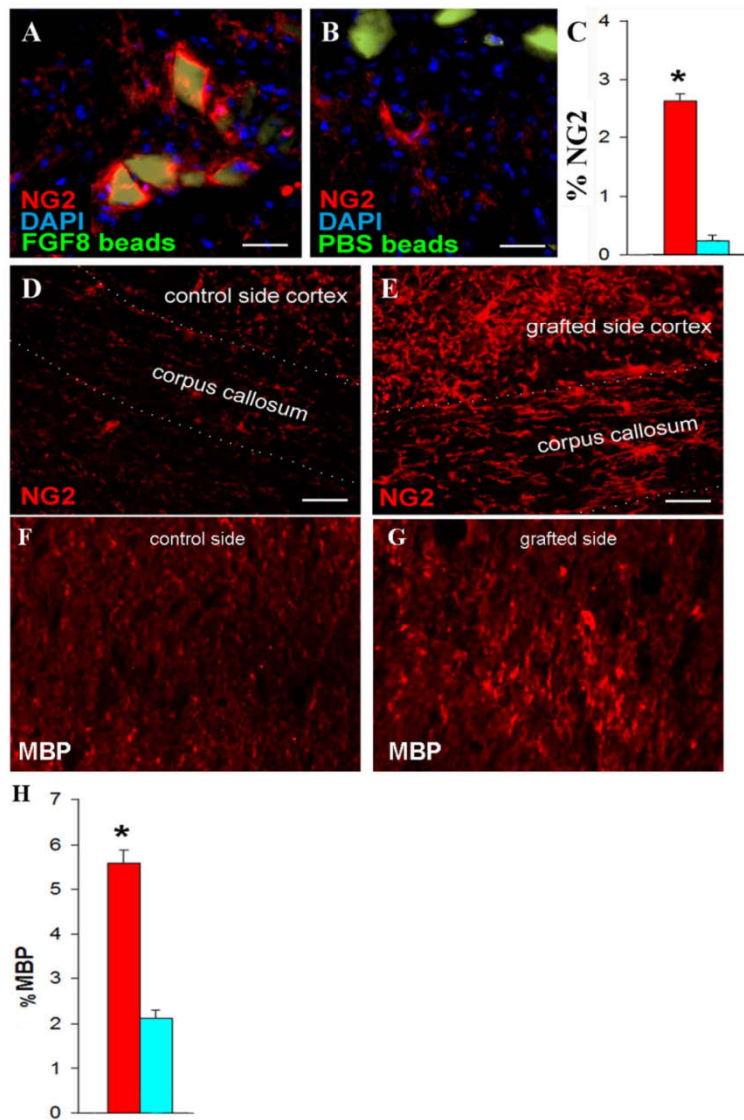


Figure 4. In Vivo Transplantation of FGF8-soaked beads in Chronically Demyelinated Mice. A) FGF8-soaked heparin beads (seen in green) surrounded by NG2-positive cells (in red). B) Control experiment where PBS-soaked beads were transplanted. C) Histogram depicting the percentage of NG2 immunoreactivity in the area injected with the heparin beads. The red bar indicates the percentage in the case FGF8-soaked beads was used, while the blue bar indicates the sham control. D) NG2 immunoreactivity in the corpus callosum and cortex in the area near the PBS-soaked beads. E) NG2 immunoreactivity in the corpus callosum and cortex in the area near the FGF8-soaked beads. F, G) MBP immunoreactivity in the area near the PBS- (blue bar) or FGF8- (red bar) soaked heparin beads. H) Histogram depicting the percentage of MBP immunoreactivity in the area injected with the PBS- (blue bar) or FGF8- (red bar) soaked heparin beads. Scale bar measures 50 μ m. * p <0.01 (paired t-test), n =4. doi:10.1371/journal.pone.0108241.g004

4 Transplantation of FGF8-Soaked Beads Activates the Migration of Oligodendrocyte Progenitor Cells In Vivo, Exerting an Attracting Effect

In order to confirm if the results observed in vitro can be extrapolated in vivo, as well as analyze if FGF8 may be used as a therapeutic tool in inducing remyelination, mice were treated with cuprizone for 12 weeks to induce a chronic demyelinating condition, similar to previous studies [13,44,45]. Then, FGF8-

soaked heparin beads were grafted on one side of the fimbria closest to the corpus callosum, while in the other side a PBS-soaked bead was grafted. As a result, 1 month after transplantation, an increase in NG2 positive cells was detected in the area where the beads were transplanted, some of which were surrounding the beads (Figure 4A). The side where PBS-soaked beads were used, on the other hand, presented lower NG2

immunoreactivity in the area compared to the group where FGF8-soaked beads were grafted (Figure 4B, C).

Also, both NG2 and MBP (oligodendrocyte progenitor cell and mature oligodendrocyte markers, respectively) immunoreactivity were detected in the corpus callosum near the area where the FGF8-soaked beads were grafted, which was not detected in the side where PBS-soaked beads were used (Figure 4D–H). Thus, FGF8-mediated stimulus was capable of reaching the corpus callosum from the fimbria.

Discussion

In this work, we have proven that FGF8 is capable of activating post-natal mouse oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) both *in vitro* and *in vivo*. Proliferation and migration of OPCs, as well as their differentiation to mature oligodendrocytes was also observed *in vitro*, indicating that this process is not hampered.

Oligodendrocytes are known to express various FGF receptors, mainly several subtypes of FGFR1, FGFR2 and FGFR3 [46]. Many works have focused on the study of the expression of these receptors, as well as the effect FGFs have on the cells, which varies throughout its lineage. For example, FGF2, when combined with PDGF-AA, is known to induce proliferation in OPCs [47,48], while mature oligodendrocytes in the presence of this growth factor revert to a progenitor state [49,50]. This indicates a negative effect in terms of differentiation and myelin production using FGF2. On the other hand, another work has shown that OPCs cultured in the presence of FGF8 expressed significantly more MBP compared to FGF2 [51], revealing a distinct effect of these two at-first similar growth factors. This same article also demonstrated that in oligodendrocyte cultures, while FGF2 downregulated mature oligodendrocyte markers and induced a reverted state, this was not observed with FGF8. In our work, we have further demonstrated FGF8 is not only capable of inducing a proliferative effect on OPCs in culture, but is also capable of attracting these cells and allowing their differentiation to myelinating oligodendrocytes. Thus, while FGF2 is useful in inducing OPC proliferation at the handicap of blocking differentiation, FGF8 seems to possess similar properties without this impediment.

References

- Steinman L (1996) Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 85: 299–302.
- Kohler W (2010) Leukodystrophies with late disease onset: an update. *Curr Opin Neurol* 23: 234–241.
- Aktas O, Kieser B, Hartung HP (2010) Neuroprotection, regeneration and immunomodulation: broadening the therapeutic repertoire in multiple sclerosis. *Trends Neurosci* 33: 140–152.
- Nave KA (2010) Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468: 244–252.
- Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X (2009) Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci* 10: 9–22.
- Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, et al. (2006) Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26: 7907–7918.
- Sellers DL, Maris DO, Horner PJ (2009) Postinjury niches induce temporal shifts in progenitor fates to direct lesion repair after spinal cord injury. *J Neurosci* 29: 6722–6733.
- Chari DM, Crang AJ, Blakemore WF (2003) Decline in rate of colonization of oligodendrocyte progenitor cell (OPC)-depleted tissue by adult OPCs with age. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 908–916.
- Chari DM, Huang WL, Blakemore WF (2003) Dysfunctional oligodendrocyte progenitor cell (OPC) populations may inhibit repopulation of OPC depleted tissue. *J Neurosci Res* 73: 787–793.
- Williams A, Piaton G, Aigrot MS, Belhadi A, Théaudin M, et al. (2007) Semaphorin 3A and 3F: key players in myelin repair in multiple sclerosis? *Brain* 130: 2554–2565.
- Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J, et al. (2008) Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain* 131: 1749–1758.
- Irvine KA, Blakemore WF (2008) Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration. *Brain* 131: 1464–1477.
- Jaramillo-Merchán J, Jones J, Ivorra JL, Pastor D, Viso-León MC, et al. (2013) Mesenchymal stromal-cell transplants induce oligodendrocyte progenitor migration and remyelination in a chronic demyelination model. *Cell Death and Disease* 4: e779.
- Eriksson AE, Cousins LS, Weaver LH, Matthews BW (1991) Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3441–3445.
- Itoh N, Ornitz DM (2004) Evolution of the FGF and FGFR gene families. *Trends in Genetics* 20: 563–569.
- Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahim OA (2005) Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 107–137.
- Gotoh N (2008) Regulation of growth factor signaling by FRS2 family docking/scaffold adaptor proteins. *Cancer Sci* 99: 1319–1325.
- Mitew S, Hay CM, Peckham H, Xiao J, Koenning M, et al. (2013) Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. *Neuroscience*.
- Botcher RT, Niehrs C (2005) Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr Rev* 26: 63–77.
- Thisse B, Thisse C (2005) Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol* 287: 390–402.
- Turner N, Grose R (2010) Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature Rev Cancer* 10: 116–129.

The mouse model used in this study, where cuprizone was added to the mice diet, results in a chronic, irreversible demyelinating model similar to the lesions observed in multiple sclerosis. If the cuprizone is removed prematurely (before the 12 weeks), remyelination is spontaneously activated, which occurs in two phases: OPCs proliferation and colonization of the demyelinated area, and differentiation towards immature oligodendrocytes that bind to the demyelinated axons and mature to myelinating oligodendrocytes. This process is regulated by the coordinated expression of soluble factors [52].

The remyelinating process observed by early cuprizone removal also occurs naturally *in vivo*. OPCs are expressed throughout the adult central nervous system, and are capable of differentiating to mature oligodendrocytes when a demyelinating lesion occurs [6]. However, in the chronic phase of multiple sclerosis, there is a multiple dysfunction in the activation of OPCs, which affects the remyelinating process [53]. This may be due to either an absence of nearby OPCs or that they are quiescent and cannot react. Regardless of the reason, the lack of soluble factors that activate the migration and differentiation of OPCs may be one of the primary reasons for this failed response. Thus, for a therapeutic approach to be effective it must be capable of stimulating the quiescent OPCs, as well as induce their migration to the damaged area. This work demonstrates that FGF8 may be used to this end.

In conclusion, FGF8 is a morphogenetic factor that may be used to induce post-natal migration, proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells. This property makes it a candidate factor that may be used in demyelinating disorders.

Acknowledgments

We would like to thank M. Rodenas, P. Almagro, C. Redondo, and J. Martínez for their technical assistance. P Cruz-Martínez is a PhD student of the doctorate program at UAB (Universitat Autònoma de Barcelona).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PCM AMF AE JJ SM JJM. Performed the experiments: PCM AMF AE JJ SM JJM. Analyzed the data: PCM AMF AE JJ SM JJM. Contributed reagents/materials/analysis tools: PCM AMF AE JJ SM. Contributed to the writing of the manuscript: JJ SM.

22. Chandran S, Kato H, Gerreli D, Compston A, Svendsen CN, et al. (2003) FGF-dependent generation of oligodendrocytes by a hedgehog-independent pathway. *Development* 130: 6599–6609.
23. Furusho M, Kaga Y, Ishii A, Hébert JM, Bansal R (2011) Fibroblast growth factor signaling is required for the generation of oligodendrocyte progenitors from the embryonic forebrain. *J Neurosci* 31: 5055–5066.
24. Crossley PH, Martin GR (1995) The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121: 439–451.
25. Crossley PH, Martínez S, Martin GR (1996) Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* 380: 66–68.
26. Reifers F, Böhlh H, Walsh EC, Crossley PH, Stainier DY, et al. (1998) *Fgf8* is mutated in zebrafish acerebellar (*ace*) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development* 125: 2381–2395.
27. Partanen J (2007) FGF signalling pathways in development of the midbrain and anterior hindbrain. *J Neurochem* 101: 1185–1193.
28. Nakamura H, Sato T, Suzuki-Hirano A (2008) Isthmus organizer for mesencephalon and metencephalon. *Dev Growth Differ* 50: S113–118.
29. Storm EE, Garel S, Borello U, Hébert JM, Martínez S, et al. (2006) Dose-dependent functions of *Fgf8* in regulating telencephalic patterning centers. *Development* 133: 1831–1844.
30. Martínez-Ferre A, Martínez S (2009) The development of the thalamic motor learning area is regulated by *Fgf8* expression. *J Neurosci* 29: 13389–13400.
31. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, et al. (1996) Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271: 15292–15297.
32. Kouhara H, Koga M, Kasayama S, Tanaka A, Kishimoto T, et al. (1994) Transforming activity of a newly cloned androgen-induced growth factor. *Oncogene* 9: 455–462.
33. Christen B, Slack JM (1999) Spatial response to fibroblast growth factor signalling in *Xenopus* embryos. *Development* 126: 119–25.
34. Corson L, Yamawaka Y, Lai K, Rossant J (2003) Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development* 130: 4527–4537.
35. Tsang M, Dawid IB (2004) Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway. *Sci STKE* 228: pe17.
36. Lunn JS, Fishwick KJ, Halley PA, Storey KG (2007) A spatial and temporal map of FGF/Erk1/2 activity and response repertoires in the early chick embryo. *Dev Biol* 302: 536–552.
37. Yang Z, Watanabe M, Nishiyama A (2005) Optimization of oligodendrocyte progenitor cell culture method for enhanced survival. *J Neurosci Methods* 149: 50–56.
38. Lee X, Yang Z, Shao Z, Rosenberg SS, Levesque M, et al. (2007) NGF regulates the expression of axonal LINGO-1 to inhibit oligodendrocyte differentiation and myelination. *J Neurosci* 27: 220–225.
39. Morello N, Bianchi FT, Marmiroli P, Tonoli E, Rodriguez Menendez V, et al. (2011) A role for hemopexin in oligodendrocyte differentiation and myelin formation. *PLOS One* 6: e20173.
40. Jones J, Estirado A, Redondo C, Bueno C, Martínez S (2012) Human adipose stem cell-conditioned medium increases survival of Friedreich's ataxia cells submitted to oxidative stress. *Stem Cells Dev* 21: 2817–2826.
41. Aarum J, Sandberg K, Haerberlein SL, Persson MA (2003) Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15983–15988.
42. Vernerey J, Macchi M, Magalon K, Cayre M, Durbec P (2013) Ciliary neurotrophic factor controls progenitor migration during remyelination in the adult rodent brain. *J Neurosci* 33: 3240–3250.
43. Baumann N, Pham-Dinh D (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological Reviews* 81: 871–927.
44. Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C (2009) The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathol* 118: 723–736.
45. Armstrong RC, Le TQ, Flint NC, Vana AC, Zhou YX (2006) Endogenous cell repair of chronic demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol* 65: 245–256.
46. Bansal R, Kumar M, Murray K, Morrison RS, Pfeiffer SE (1996) Regulation of FGF receptors in the oligodendrocyte lineage. *Mol and Cell Neurosci* 7: 263–275.
47. McKinnon RD, Matsui T, Dubois-Dalcq M, Aaronson SA (1990) FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron* 5: 603–614.
48. Bogler O, Wren D, Barnett SC, Land H, Noble M (1990) Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6368–6372.
49. Grinspan JB, Stern JL, Franceschini B, Pleasure D (1993) Trophic effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on differentiated oligodendroglia: a mechanism for regeneration of the oligodendroglial lineage. *J Neurosci Res* 36: 672–680.
50. Fressinaud C, Vallat JM, Labourdette G (1995) Basic fibroblast growth factor down-regulates myelin basic protein gene expression and alters myelin compaction of mature oligodendrocytes in vitro. *J Neurosci Res* 40: 285–293.
51. Fortin D, Rom E, Sun H, Yayon A, Bansal R (2005) Distinct fibroblast growth factor (FGF)/FGF receptor signaling pairs initiate diverse cellular responses in the oligodendrocyte lineage. *J Neurosci* 25: 7470–7479.
52. Chari DM (2007) Remyelination in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 79: 589–620.
53. Sim FJ, Zhao C, Penderis J, Franklin RJ (2002) The age-related decrease in CNS remyelination efficiency is attributable to an impairment of both oligodendrocyte progenitor recruitment and differentiation. *J Neurosci* 22: 2451–2459.

Los resultados preliminares de esta Tesis Doctoral fueron presentados en los siguientes Congresos y Jornadas Científicas:

- Jaramillo-Merchán, J., Jones, J., Bueno, C., Cristóbal-Bilbao, R., Pastor, D., Viso-Leon, M. C., Ghandour, M. S. & Martínez, S. (2011). Remyelination by 158N Oligodendrocyte Cell Line Grafting in a Chronic Demyelination Model. *VI Congreso De La Sociedad Española De Terapia Génica Y Celular*. Zaragoza, España. Póster O-072.
- Jaramillo-Merchán, J., Jones, J., Ivorra, J. L., Muñoz-Ballester, C., Moltó, M. D. & Martínez, S. (2011). Trophic Factor Induced-Stimulation of Oligodendrocyte Progenitor Cells After Mesenchymal Stem Cell Transplantation. Role of Fgf8 in Remyelination. *10th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease*. Prague, Czech Republic. Póster 1-77.
- Jones, J., Jaramillo-Merchán, J., Viso-Leon, M. C., Pastor, D. & Martínez, S. (2011). Oligodendrocyte Progenitor Cell Activation Mediated by Mesenchymal Stem Cell Transplantation, Restores Axon Potential Velocity in a Chronic Demyelinating Mouse Model. *10th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease*. Prague, Czech Republic. Póster 2-77.
- Jaramillo-Merchán, J., Bueno, C., Ramírez, C., Pastor, D., Viso-Leon, M. C., Mira-Pascual, L., Torres-Pérez, J. V., Jones, J & Martínez, S. (2011). Axon Regeneration Properties of Human Periodontal Ligament Stem Cells. *8th International Brain Research Organization (IBRO) World Congress Of Neuroscience*. Florence, Italy. Póster B082.
- Jaramillo-Merchán, J., Ivorra, J. L., Jones, J., Muñoz-Ballester, C., Moltó, M. D. & Martínez, S. (2011). Mesenchymal Stem Cells Activate Genes Involved in Neurorepair and Remyelination. *3rd European Molecular Biology Organization (EMBO) Stem Cell Conference. "Advances In Stem Cell Research: Development, Regeneration And Disease"*. Institute Pasteur. París, France. Póster 73.
- Jaramillo-Merchán, J., Jones, J., Pastor, D., Viso-Leon, M. C., Geijo-Barrientos, E. & Martínez, S. (2011). Mesenchymal Stem Cells Restore Axon Potential Velocity in Demyelinated Axons. *3rd European Molecular Biology Organization (EMBO) Stem Cell Conference. "Advances In Stem Cell Research: Development, Regeneration And Disease"*. Institute Pasteur. París, France. Póster 74.
- Jones, J., Jaramillo-Merchán, J., Pastor, D., Viso-Leon, M. C. & Martínez, S. (2011). Stem Cell Therapy in Neurodegenerative Diseases. *6th CCH International Symposium of Genomics Research*. Taipéi. Taiwan. Ponente: Jones, J.

- Jaramillo-Merchán, J. (2010). Tratamientos de la Esclerosis Múltiple. *IV Jornadas Técnicas sobre Esclerosis Múltiple. Asociación de Esclerosis Múltiple de Elche y Comarca*. Elche. España. Ponente: Jaramillo-Merchán, J.
- Jaramillo-Merchán, J. (2010). Terapia Celular para Enfermedades Desmielinizantes. *III Jornadas sobre Esclerosis Múltiple: Nuevas perspectivas terapéuticas en Esclerosis Múltiple. Asociación Española de Esclerosis Múltiple – Ciudad Real*. Ciudad Real. España. Ponente: Jaramillo-Merchán, J.
- Jaramillo-Merchán, J., Jones, J., & Martínez, S. (2010). Remielinización Mediante Trasplante de Células Madre Mesenquimales en un Modelo de Leucodistrofia. *II Encuentro de Adultos con algún tipo de Leucodistrofia. Asociación Europea contra la Leucodistrofia (ELA) – España*. Burgos. España. Ponente: Jaramillo-Merchán, J.
- Jaramillo-Merchán, J., Jones, J., Pastor, D., Viso-Leon, M. C. & Martínez, S. (2010). Mesenchymal Stem Cells Induce Re-Myelination in the Fimbria of Cuprizone-Induced Demyelinated Mice. *Diagnostic and Therapeutic Approaches in Leukodystrophies. European Leukodystrophy Association-Spain. Myelinet*. Burgos. Spain. Ponente: S. Martínez.
- Jaramillo-Merchán, J., Jones, J., Pastor, D., Viso-Leon, M. C. & Martínez, S. (2009). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Attract Oligodendrocyte Precursors and Induce Myelin Production in a Toxic Model of Leukodystrophy. *V Congreso de la Sociedad Española de Terapia Génica y Celular*. Granada, España. Póster P060. *Human Gene Therapy* (2009) 9, 1069.
- Jaramillo-Merchán, J., Jones, J., Pastor, D., Viso-Leon, M. C. & Martínez, S. (2009). Células Madre Mesenquimales de la Médula Ósea Atraen Precursores Oligodendrocíticos e Inducen Remielinización al Trasplantar en un Modelo Tóxico de Leucodistrofia. *XIII Congreso de la Sociedad Española de Neurociencias*. Tarragona, España. Póster P274.
- Jaramillo-Merchán, J., Jones, J. & Martínez, S. (2009). Mouse Mesenchymal Stem Cells Induce Re-Myelination in the Fimbria of Cuprizone-Induced Demyelinated Mice. *VII congress of International Society for Stem Cell Research (ISSCR)*. Barcelona, Spain. Póster 149.
- Jaramillo-Merchán, J., Jones, J. & Martínez, S. (2009). Remyelination in a Tóxico Model of Leukodystrophy Using Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *2nd ELA Research Foundation Research*. Luxembourg, Luxembourg. Póster P8-02.

- Mira-Pascual, L., Torres-Pérez, J. V., Jaramillo-Merchán, J. & Martínez, S. (2009). Potencialidad Remielinizante de Células Madre del Ligamento Peridontal y de la Pulpa Dental Humanas en un Modelo de Leucodistrofia. *XXVII Congreso Nacional de Estudiantes de Medicina. V International Edition*. Alicante. España. Póster.
- Cristóbal-Bilbao, R., Jaramillo-Merchán, J & Martínez, S. (2009). Potencialidad Remielinizante de Progenitores Oligodendrogliales en un Modelo de Leucodistrofia. *XXVI Congreso Nacional de Estudiantes de Medicina. V International Edition*. Alicante. España. Ponente: Cristóbal-Bilbao, R.
- Jaramillo-Merchán, J., Jones, J. & Martínez, S. (2008). Re-Myelination by Mesenchymal Stem Cells. *International Symposium on Rare Diseases. Inherited Neuromuscular Diseases: Traslacion from Pathomechanisms to Therapies*. Valencia, Spain. Póster 38.
- Rodríguez, V., Tarí, I., Jaramillo-Merchán, J. & Martínez, S. (2008). Restaurando la Mielina con Trasplante de Células. *XXVI Congreso Nacional de Estudiantes de Medicina. IV International Edition*. Alicante. España. Ponentes: Rodríguez, V., Tarí, I.

