



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Biotecnología

Efecto de la estimulación optogenética en la diferenciación de progenitores neurales y su aplicación para la terapia celular.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Biomédica

AUTOR/A: Janeir Garazatúa, Sahira

Tutor/a: Giraldo Reboloso, Esther

Cotutor/a externo: Moreno Manzano, Maria Victoria

Director/a Experimental: Sanchez Martin, Maria del Mar

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



Máster Universitario en
Biotecnología
Biomédica



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

EFFECTO DE LA ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA EN LA DIFERENCIACIÓN DE PROGENITORES NEURALES Y SU APLICACIÓN PARA LA TERAPIA CELULAR.

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNA: Sahira Janeir Garazatúa

TUTORA UPV: Esther Giraldo Reboloso

TUTORA EXTERNA: Victoria Moreno Manzano

TUTORA EXPERIMENTAL: María del Mar Sanchez

Curso Académico: 2022-2023

VALENCIA, SEPTIEMBRE 2024

TÍTULO: EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN OPTOGENÉTICA EN LA DIFERENCIACIÓN DE PROGENITORES NEURALES Y SU APLICACIÓN PARA LA TERAPIA CELULAR.

RESUMEN: La lesión medular (LM) afecta significativamente la función motora, sensorial y autonómica, con consecuencias sanitarias, sociales y económicas importantes. Actualmente, no existen terapias efectivas para los pacientes con LM, lo que resalta la gravedad de estas lesiones y la urgente necesidad de investigaciones que conduzcan a tratamientos viables. Las estrategias de tratamiento actuales incluyen neuroprotección, terapia celular, remoción de moléculas inhibitoras, regeneración axonal, soporte trófico, remielinización y rehabilitación. La terapia celular ha mostrado resultados prometedores especialmente con el uso de células precursoras neurales (NPCs) al reemplazar el tejido neuronal perdido y modular el microambiente de la lesión. Sin embargo, aún existen desafíos en la supervivencia del injerto y en la diferenciación neuronal efectiva.

En este contexto, la optogenética se presenta como una técnica innovadora que combina métodos ópticos y genéticos para controlar la actividad celular con precisión temporal y espacial. La optogenética utiliza opsinas fotosensibles que permiten la activación celular mediante la luz. Esta técnica ha demostrado potencial en la mejora de la terapia celular al incrementar la supervivencia y diferenciación de NPCs, así como en la reducción del microambiente inflamatorio. En este trabajo, proponemos que la estimulación optogenética de NPCs fetales *in vitro* en el contexto de la terapia celular para el tratamiento de la LM, podría mejorar sus capacidades neuroregenerativas a través de la modulación de eventos celulares y moleculares en estas células y que podría tener un efecto paracrino sobre la reactividad astrocítica. Las NPCs fueron transducidas empleando un vector viral adeno-asociado (AAV) para expresar ectópicamente la opsina canalrodopsina 2 (ChR2).

El estudio del proto-oncogen Fos (c-Fos) reveló que se necesitan 2 estimulaciones para activar las NPC-ChR2, y que aquellas NPC sin transducir también se activan de manera paracrino. El estudio de viabilidad demostró que la estimulación optogenética no afecta la supervivencia ni proliferación celular. La estimulación optogenética *in vitro* de NPCs en condiciones de diferenciación espontánea, no promovió su diferenciación a ningún tipo celular en particular, pero sí favoreció cambios fenotípicos de astrocitos derivados de NPCs hacia astrocitos fibrosos anti-inflamatorios. Además, disminuyó la expresión de marcadores pro-inflamatorios e incrementó marcadores anti-inflamatorios tanto en astrocitos derivados de NPCs que expresaban ectópicamente ChR2 como en aquellos no transducidos, indicando efectos paracrinos. En línea con esto, se observó un efecto paracrino positivo de las NPC-ChR2 estimuladas sobre astrocitos maduros, reduciendo la reactividad y promoviendo un ambiente neuroprotector tanto en marcadores proteicos como transcriptómicos. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se detectan efectos paracrinos *in vitro* tras la estimulación optogenética en el contexto de las terapias celulares para tratar la LM. Nuestros hallazgos resaltan el notable potencial de la terapia optogenética de NPCs sobre la neuroregeneración y modulación del microambiente de la lesión, ofreciendo un enfoque prometedor para el tratamiento de la LM.

PALABRAS CLAVE: Progenitores neurales; astrocitos; lesión medular; optogenética; canalrodopsina.

AGRADECIMIENTOS

Con la entrega de este trabajo, concluyo una etapa que ha sido, sin duda, una de las más significativas en mi vida, tanto a nivel personal como profesional. Han sido 2 años de esfuerzo, sacrificio, risas y lágrimas, pero, sobre todo, de crecimiento. Y todo este camino no lo he recorrido sola, sino acompañada por personas excepcionales a quienes quiero expresar mi más profundo agradecimiento.

En primer lugar, a mi familia, mi sostén en los momentos más difíciles y mi fuente de alegría en los más felices, aún incluso estando a un océano de distancia. Mamá y papá e Ivan, todo lo que soy y lo que he logrado se lo debo a ustedes. Gracias por creer en mí, y por enseñarme que, con esfuerzo y perseverancia, todo es posible.

A mi novio, Rubén, por apoyarme y cuidarme cuando estaba estresada porque me faltaba tiempo, traerme la cena, entenderme o simplemente permanecer en silencio al lado mío como apoyo moral. Gracias por ser un gran compañero.

A mis amigos, gracias por las noches de estudio y de biblioteca compartidos, por las conversaciones que aliviaban el estrés, y por la cantidad de lindos momentos que vivimos en estos 2 años.

A mis tutoras y mentores del laboratorio, quienes me guiaron y transmitieron el valor de la curiosidad y el rigor científico. Gracias, Esther, por tu paciencia, por responder a mis preguntas sin descanso, cada corrección, y por cada consejo que me has dado en este proceso. A María del Mar, por tu orientación en el mundo del laboratorio, por enseñarme con tanta dedicación y pasión, y por ser una guía constante. Vicky, gracias por acogerme en el equipo, por dejarme investigar y aprender de un tema que me gusta mucho, y por permitirme aprender de vos y de tu experiencia las veces que estuvimos juntas en el laboratorio.

A Guillem, Anita, Erik, y Loris mis compañeros del I-44, gracias por el compañerismo, por las risas, las comidas, y por esos momentos que hicieron que el esfuerzo valiera la pena. Cada uno de ustedes ha hecho que este camino sea mucho más que un simple paso académico; han sido una parte fundamental en mi desarrollo.

Finalmente, a todos aquellos profesores que a lo largo de mis estudios me inspiraron con su pasión por la enseñanza, y que me motivaron a seguir adelante, incluso en los momentos más duros. Su dedicación ha dejado una huella imborrable en mi vida, y les estaré eternamente agradecida.

Gracias a todos por ser parte de mi (pequeña) historia, por contribuir a mi formación y por ayudarme a ser la persona que hoy presenta este trabajo con orgullo y gratitud.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en las reacciones de inmunofluorescencia celular.....	22
Tabla 2. Anticuerpos secundarios empleados en las reacciones de inmunofluorescencia celular.....	22
Tabla 3. Primers de ARN forward y reverse empleados en las reacciones de qPCR	23

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Fases fisiopatológicas temporales tras la lesión en la médula espinal	4
Figura 2. Estrategias de tratamiento para la LM	9
Figura 3. Planteamiento del trasplante celular y fuentes de obtención para los diferentes tipos celulares	11
Figura 4. Funcionamiento de opsinas utilizadas en optogenética	13
Figura 5. Parámetros de estimulación optogenética celular con el dispositivo LED ..	16
Figura 6. Protocolo de extracción de NPCs de embriones de rata de 13.5 días	17
Figura 7. Transducción viral NPCs	18
Figura 8. Protocolo de diferenciación de NPCs	19
Figura 9. Diseño de experimento c-Fos.....	19
Figura 10. Cultivo primario de astrocitos maduros a partir de médula espinal de ratas postnatales	20
Figura 11. Diseño de experimento de Cocultivo NPCs-Astroцитos ... ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 12. Eficiencia de transducción de ChR2 y Tdtomato en NPCs	24
Figura 13. Activación de la ChR2 mediante estimulación optogenética con LED	27
Figura 14. Efecto de la estimulación optogenética sobre la viabilidad de NPC-ChR2	29
Figura 15. Efecto de la estimulación optogenética sobre la diferenciación de oligodendrocitos	30
Figura 16. Efecto de la estimulación optogenética sobre la diferenciación neuronal	31
Figura 17. Efecto de la estimulación optogenética sobre la diferenciación astrocítica	33
Figura 18. Efecto de la estimulación optogenética sobre la morfología de astrocitos provenientes de NPC-ChR2.....	34
Figura 19. Efecto de la estimulación optogenética sobre el marcador de reactividad astrocítico NF-κB.....	36
Figura 20. Efecto de la estimulación optogenética sobre el marcador de efectos anti-inflamatorios Arginasa	37
Figura 21. Efecto paracrino de la estimulación optogenética de NPC-ChR2 sobre los niveles de ARNm de marcadores de reactividad en astrocitos maduros	39
Figura 22. Efecto paracrino de la estimulación optogenética de NPC-ChR2 sobre la reactividad en astrocitos maduros mediante marcadores proteicos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios	41

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Activación de la ChR2 mediante estimulación optogenética con LED	53
Anexo 2. Efecto de la estimulación optogenética sobre NF-κB de astrocitos diferenciados de NPC-ChR2 y NPC sin transducir.....	53
Anexo 3. Efecto de la estimulación optogenética sobre la arginasa de astrocitos diferenciados de NPC-ChR2 y NPC sin transducir	54

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Anatomía de la médula espinal	1
1.2 Lesión medular (LM)	1
1.2.1 Características fisiopatológicas de la LM	2
1.2.2 Formación de la cicatriz glial	4
1.2.3 Rol dual de la cicatriz glial	5
1.3 Estrategia de tratamientos	6
1.4 Terapia celular en la LM	9
1.4.1 NPCs en la terapia celular de LM	11
1.5 Optogenética	12
1.5.1 Tipos de opsinas	13
1.5.2 Aplicación de la optogenética al tratamiento de la LM	14
1.6 Corolario de la Introducción	14
2.OBJETIVOS	15
3.MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 Estimulación optogenética	16
3.2 Obtención y mantenimiento de NPCs	16
3.2.1 Obtención del cultivo primario y criopreservación	16
3.2.2 Pasaje, disgregado y mantenimiento	17
3.2.3 Transducción viral	17
3.2.4 Protocolo de diferenciación	18
3.2.5 Determinación de la activación de NPCs estimuladas optogenéticamente	19
3.3 Obtención y cultivo primario de astrocitos procedentes de médula espinal	20
3.3.1 Mantenimiento del cultivo primario de astrocitos de ME	21
3.4 CoCultivo NPCs-Astrocitos	21
3.5 Inmunofluorescencia celular	21
3.6 Extracción de ARN, retro-transcripción y qPCR	22
3.7 Análisis de imagen	23
3.8 Análisis Estadístico	24
4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1 Estudio del funcionamiento in vitro del mecanismo de estimulación optogenética	24

4.1.1 La eficiencia de transducción de Chr2 y Tdtomato en NPCs varía entre ellas, y es baja en ambas	24
4.1.2 La estimulación optogenética permite la activación de NPC-ChR2 y genera activación paracrina en NPCs sin transducir.....	26
4.2 Efecto de la estimulación optogenética in vitro sobre la diferenciación de NPC-ChR2.....	28
4.2.1 La estimulación optogenética diaria no afecta la viabilidad de las NPC-ChR2	28
4.2.2 La estimulación optogenética in vitro no favorece la diferenciación de las NPCs a ningún tipo celular en particular	29
4.2.3 La estimulación optogenética de NPC-ChR2 favorece la maduración astrocítica a distintos subtipos morfológicos	33
4.2.4 La estimulación optogenética permite la disminución de marcadores pro-inflamatorios e induce la expresión de marcadores anti-inflamatorios en astrocitos derivados de NPCs-ChR2 diferenciadas	35
4.3 Estudio del efecto paracrino de la estimulación optogenética de NPC-ChR2 sobre la reactividad de astrocitos maduros.....	38
4.3.1 La estimulación optogenética de NPC-ChR2 induce efectos paracrinicos en astrocitos maduros en cocultivo al disminuir la transcripción de genes reactivos, mientras que la luz LED directa sobre astrocitos incrementa su reactividad	38
4.4 Limitaciones y perspectivas futuras	41
5 CONCLUSIONES.....	42
6 BIBLIOGRAFÍA.....	44
7 ANEXO.....	53

LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAV	Vector viral adeno-asociado
AAV9	Vector viral adeno-asociado serotipo 9
AD-MSC	Células madre mesenquimales de tejido adiposo
AINE	Antiinflamatorios no esteroides
ArchT	Arqueerhodopsina
ATP	Adenosin trifosfato
BDNF	Factor de crecimiento derivado del cerebro
BHE	Barrera hematoencefálica
BL	Luz azul a 470 nm
BM-MSC	Células madre mesenquimales de médula ósea
BSA	Albúmina de Suero Bovino
BSME	Barrera sangre-médula espinal
C1q	Componente del complemento 1q
C3	Componente del complemento 3
Ca ²⁺	Calcio
CAG	Chicken β -actin
CAMK	CAM quinasa
c-Fos	Proto-oncogen Fos
ChABC	Chondroitinasa ABC
ChloC	Canalrodopsinas conductoras de cloruro
ChR2	Canalrodopsina 2
ChRs	Canalrodopsinas
CMV	Citomegalovirus
CREB	Elemento de unión con respuesta cAMP
CSPGs	Proteoglicanos de sulfato de condroitina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsufóxido
EGF	Factor de crecimiento epitelial
Elk-1	Gen tipo1 ETS
ESCs	Células madre embrionarias

FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GAGs	Glucosaminoglicanos
GDNF	Factor de crecimiento derivado de células gliales
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
GTP	Guanosin trifosfato
HSC	Células madre hematopoyéticas
HSPGs	Proteoglicanos de heparán sulfato
Iba-1	Molécula adaptadora de unión al calcio ionizado
IFN- γ	Interferon gamma
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
iPSC	Células madre pluripotentes inducidas
LamR	Receptor de laminina
LÁSER	Amplificador de luz por emisión estimulada de radiación
LEDs	Diodos emisores de luz
LM	Lesión medular
LPS	Lipopolisacáridos
MAPK	MAP quinasa
ME	Médula espinal
MEC	Matriz extracelular
MSCs	Células madre mesenquimales
NF κ B activadas	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B
NG2	Antígeno 2 neuroglial
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NGS	Normal Goat Serum
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor de N-metil-D-aspartato
NPCs	Células progenitoras neurales
NpHR	halorrodopsina
NSCs	Células madre neurales

NT	Neurotrofina
NT-3	Neurotrofina-3
OEC	Células envolventes olfativas
OLIG-2	Factor de transcripción de oligodendrocitos 2
ON	Óxido Nítrico
OPCs	Células progenitoras de oligodendrocitos
OptoXR	Canalrodopsinas manipuladas con receptores acoplados a proteína G
P	Penicilina
PBS	Tampón fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
pSTAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
rcf	Fuerza centrífuga relativa
RE	Retículo endoplásmico
RFP	Proteína fluorescente roja
Rybp	Ring1 and YY1 binding protein
S	Estreptomina
SEM	Error estándar de la media
SKP	Precursos derivados de piel
SNC	Sistema nervioso central
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TrkB	Tirosin kinasa B
U-MSC	Células madre mesenquimales de cordón umbilical
VDCC	Canales de calcio dependientes del voltaje
XT-1	Xilosiltransferasa-1

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Anatomía de la médula espinal

La médula espinal (ME) es una estructura nerviosa longitudinal del sistema nervioso central (SNC) que se ubica dentro y a lo largo del canal vertebral. Funciona como un centro de intercambio de información transmitiéndola del cuerpo hacia el cerebro a través de vías sensoriales ascendentes que entran por raíces dorsales y de manera inversa, a través de vías motoras descendentes que salen de la médula por raíces ventrales segmentales. Es por esto, que ocupa una posición única y central en las interacciones entre el SNC y todas las demás estructuras del cuerpo. En humanos la longitud aproximada es de 45 cm comenzando en el extremo caudal del tronco encefálico, donde sale del foramen magno en la base del cráneo y extendiéndose hasta el primer nivel vertebral lumbar (L1). En cuanto a su morfología, es más o menos cilíndrica (con aplanamiento anteroposterior) siguiendo la curvatura de la columna vertebral y variando el grosor según los niveles vertebrales. Además, se encuentra cubierta no solo por la estructura ósea externa de las vértebras sino también por las tres capas de meninges: duramadre, piamadre y aracnoides.

En cuanto a su composición la región interna tiene forma de H y está formada por materia gris, donde se localizan los cuerpos celulares de las motoneuronas e interneuronas que reciben entradas por el asta dorsal de vías descendentes, vías propioespinales intersegmentarias y aferentes sensoriales periféricos a través de varias vías segmentarias. Las interneuronas proyectan a otras interneuronas, o proyectan su axón a través de tractos ascendentes/descendentes. En el asta ventral, las motoneuronas integran múltiples tipos de entradas responsables de la ejecución del movimiento (es decir, forman la vía final común). Dicha región interna se encuentra delimitada por la materia blanca, que incluye células gliales y las fibras axónicas de los tractos sensoriales y motores que llevan la información (**Figura 1**). Además, en la ME se encuentran presentes tipos específicos de neuroglia del sistema nervioso central, tales como oligodendrocitos, astrocitos, microglía y células ependimarias. En el microambiente, estas células se encuentran inmersas en una matriz extracelular (MEC) que incluye componentes como laminina, fibronectina, diversos tipos de proteoglicanos (proteoglicanos de condroitin sulfato (CSPGs), proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs), hialuronano, semaforinas, factores de crecimiento y otras proteínas que desempeñan roles fundamentales en su estructura y función (Selzer et al., 2014).

1.2 Lesión medular (LM)

Se estima que, en el 2021, aproximadamente 15,4 millones de personas en el mundo habían sufrido una LM (WHO, 2024), y que el costo medio del cuidado de cada paciente varía el primer año tras la lesión entre €32,240 y €1,156,400; y los años subsiguientes entre €4,490 y €251,450 (Badhiwala et al., 2019; Malekzadeh et al., 2022). Aunque algunos tratamientos preclínicos individuales han demostrado cierta eficacia al intentar promover tanto la neuroprotección -para limitar la extensión de la pérdida neurológica- como la regeneración -estimulando cierto crecimiento axonal dentro o alrededor de los sitios de la lesión-, su traducción en aplicaciones clínicas eficientes sigue siendo muy decepcionante, y no se ha conseguido restaurar la pérdida de la función neurológica. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas y más efectivas terapias regenerativas para un tratamiento traslacional de la LM.

Cualquier daño o lesión de la ME puede dañar tanto vías motoras como sensoriales y bloquear la transmisión de la información. En la mayoría de los casos este daño proviene

de traumas, pero también puede surgir en el por causas no traumáticas como infecciones, intoxicación, tumores, degeneración por la edad, entre otras (WHO, 2024) y los síntomas se correlacionan en gran medida con las vías lesionadas y el nivel o tamaño de la lesión. Es por eso que esta interrupción entre las entradas sensoriales periféricas, el SNC y el aparato motor es devastadora y puede resultar en la pérdida permanente completa o incompleta (manteniendo alguna conectividad neuronal) de las funciones sensoriales, motoras y/o autónomas por debajo del nivel de la lesión, así como en condiciones secundarias debilitantes o incluso potencialmente mortales (trombosis venosa, dolor crónico, osteoporosis, etc.), y dado que la mayoría de las lesiones ocurren a nivel cervical, el control de los músculos de las extremidades superiores (en lesiones cervicales altas), el tronco y las extremidades inferiores se ve comúnmente afectado (Assinck et al., 2017; Courtine & Sofroniew, 2019; WHO, 2024).

El impacto significativo en el ámbito personal, profesional y social de los pacientes con LM, la reducción en la calidad de vida y los considerables factores económicos, hacen que sea necesario investigar esta condición para intentar contribuir en la recuperación de la funcionalidad motora de estos pacientes.

1.2.1 Características fisiopatológicas de la LM

La LM implica una serie de respuestas secundarias tanto locales como sistémicas que se desencadenan a raíz de un daño primario inicial. Estas fases secundarias agravan el daño inicial mientras simultáneamente se activan mecanismos endógenos que intentan promover la curación y la regeneración. La evolución de la LM puede categorizarse en cuatro etapas distintas: la fase primaria aguda, la fase secundaria aguda, la fase subaguda y la fase crónica (**Figura 1**) (Fehlings et al., 2013; Gong et al., 2020)

- **Fase aguda primaria:** Inmediatamente después de la lesión y durante las siguientes dos horas, las células, particularmente las neuronas y sus axones, experimentan una permeabilización aguda causada por fuerzas compresivas y de cizallamiento. Esta situación provoca la pérdida de funcionalidad y la muerte celular rápida. El impacto físico inicial no solo compromete a las neuronas, sino que también daña la vasculatura local, lo que resulta en edema y hemorragias, especialmente en la materia gris altamente vascularizada y, en menor medida, en la materia blanca. Además, se producen daños en las capas meníngeas y en las raíces espinales (dorsales y ventrales), así como hemorragias en los espacios subdural y subaracnoideo (Witiw & Fehlings, 2015; Gong et al., 2020; Anjum et al., 2020; Huang et al., 2021). El daño neuroanatómico inmediato incluye la parálisis de neuronas que gestionan funciones motoras, sensoriales y autonómicas en el nivel afectado. Asimismo, el daño axonal en este mismo nivel interrumpe la comunicación a través de los tractos de materia blanca aferentes y eferentes, que son esenciales para transmitir señales más allá del lugar de la lesión. Las fibras nerviosas dañadas distales al sitio de la lesión comienzan a descomponerse en un proceso conocido como degeneración Walleriana. Frecuentemente se observa un borde subpial de axones sobrevivientes que atraviesa la zona lesionada, mostrando varios estados de desmielinización. Además, los axones de las neuronas motoras superiores que atraviesan la zona lesionada, en tractos como el corticoespinal, también resultan afectados, ocasionando la pérdida de control eferente sobre los músculos situados por debajo del nivel de la lesión. Esta disfunción se manifiesta inmediatamente como un fenómeno conocido como shock espinal, cuya naturaleza y mecanismos subyacentes aún son poco comprendidos (Witiw & Fehlings, 2015; Gong et al., 2020; Anjum et al., 2020).

- **Fase aguda secundaria:** Hasta las 48 horas tras el trauma, el daño se extiende más allá del sitio original de la lesión. Esto se debe a una cascada de eventos celulares y moleculares que incluyen la inflamación, la excitotoxicidad y el estrés oxidativo. El trauma inicial daña los vasos sanguíneos, lo que lleva a una perturbación de la barrera sangre-médula espinal (BSME). Esto permite la entrada de células y proteínas del sistema inmunológico en el tejido neural, lo que puede aumentar la inflamación y el daño. Se activa una intensa respuesta inflamatoria que, aunque es parte del proceso natural de curación, puede exacerbar el daño. Los macrófagos, linfocitos y microglía activada y otros leucocitos se infiltran en el sitio de la lesión, liberando citocinas y mediadores inflamatorios lo cual conlleva a la muerte celular predominantemente necrótica y en menor medida apoptótica. El edema, o hinchazón, resulta de la acumulación de fluido en el tejido espinal, lo que puede aumentar la presión intratecal y dañar aún más las células nerviosas. La hemorragia también puede contribuir a este proceso. A su vez, la perturbación de la vasculatura puede reducir el flujo sanguíneo a áreas críticas de la ME, privando a las células de oxígeno y nutrientes necesarios, lo que lleva a la muerte celular isquémica. Con el tiempo, el área de la lesión puede estabilizarse formando una cavidad quística que está rodeada por una cicatriz glial, lo cual puede impedir la regeneración de axones y la recuperación funcional. Esta fase es crítica es crítica en el impacto a largo plazo que puede tener en la recuperación porque las intervenciones en este período pueden potencialmente reducir la magnitud del daño y mejorar los resultados de recuperación (Witiw & Fehlings, 2015; Gong et al., 2020; Anjum et al., 2020; Huang et al., 2021).
- **Fase subaguda:** La fase subaguda de la LM comienza alrededor de 2 días después de la lesión y puede extenderse hasta 2 semanas en modelos animales, mientras que en humanos este período puede durar desde 2 semanas hasta 6 meses. Esta etapa está marcada por procesos tanto patológicos como reparadores que se desarrollan de forma simultánea. Inicialmente, se observa una intensa infiltración de células inmunitarias y una activa remodelación de la MEC. Esta remodelación implica el relleno de la cavidad quística con tejido fibroso por parte de fibroblastos, formando una cicatriz fibrótica o núcleo de la lesión que ayuda a estabilizar la estructura física de la ME, pero también puede actuar como una barrera para la regeneración neural. Además, durante esta fase, continúa la desmielinización y degeneración axonal, acompañada de muerte celular tardía. Paralelamente, se activan procesos reparadores beneficiosos, como la proliferación de células progenitoras endógenas, la eliminación de desechos celulares, y la angiogénesis. Además, los astrocitos que han sobrevivido a las fases de lesión primaria y secundaria aguda se activan y proliferan, formando una cicatriz glial, un borde denso que limita el núcleo de la lesión. Este fenómeno, conocido como astrogliosis, crea una "red heteromórfica" que, aunque proporciona estabilidad y contención al daño, puede constituir un obstáculo para la regeneración de axones (Witiw & Fehlings, 2015; Gong et al., 2020; Anjum et al., 2020; Huang et al., 2021).
- **Fase crónica:** En la fase crónica de la LM, la cicatriz glial desempeña un papel continuo en la contención del tejido fibrótico y los macrófagos. En esta fase también se producen eventos de degeneración walleriana. En ciertas circunstancias, los astrocitos que forman parte de la cicatriz pueden actuar como puentes facilitadores para el crecimiento de los axones (Yang et al., 2020; Sabre et al., 2016; Anjum et al., 2020; Huang et al., 2021).

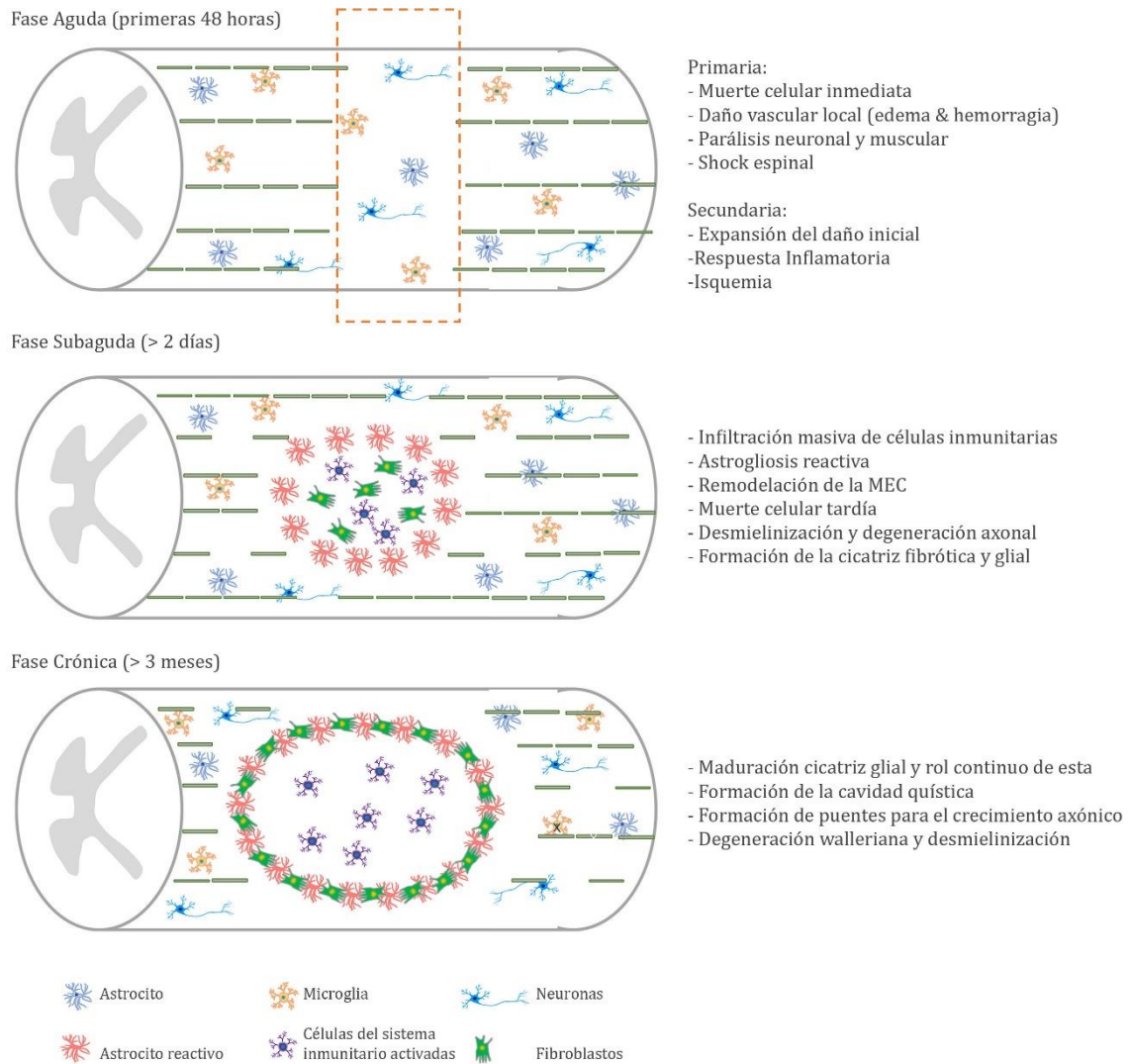


Figura 1. Fases fisiopatológicas temporales tras la lesión en la médula espinal. Tras 48 horas de la LM tiene lugar una fase aguda, tras 2 días una subaguda y finalmente una fase crónica. Cada fase se caracteriza por una serie de mecanismos moleculares que culminan con la formación de una cicatriz glial. MEC: Matriz Extracelular; Hs: Horas. Adaptado de Huang et al., 2021.

1.2.2 Formación de la cicatriz glial

Como se describió anteriormente, algunos astrocitos juegan un rol en la formación de la cicatriz glial. A aquellos involucrados se los conoce como “astrocitos formadores de cicatriz” o astrocitos reactivos. Este tipo celular provee soporte y nutrientes a las neuronas, regulan la barrera hematoencefálica (BHE) la función sináptica y la captación de glutamato, y participan en procesos patológicos. Morfológicamente, la mayoría de los astrocitos reactivos son esencialmente similares a los astrocitos normales en la ME ilesa, pero difieren de los normales en la hipertrofia celular (Wanner et al., 2013). Por su parte, para que los astrocitos formadores de cicatriz logren cumplir su rol, deben sufrir tras la lesión una serie de procesos de activación que se comentan a continuación:

- **Activación astrocítica luego de LM (horas):** Las células dañadas tras la lesión liberan adenosin trifosfato (ATP), que actúa sobre una variedad de receptores purinérgicos expresados por astrocitos, microglía, oligodendrocitos y células progenitoras de oligodendrocitos (OPC) y desencadena los estados activados de estas células. Además, la activación de los astrocitos también puede ser

desencadenada y amplificada por múltiples factores inflamatorios, incluidos el factor de necrosis tumoral (TNF), Interferon gamma (IFN- γ), Interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 beta (IL-1 β) (Liddelow et al., 2017). Algunos indicadores de activación de los astrocitos como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (pSTAT3), el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF κ B) y CSPGs aumentan significativamente a las pocas horas de la lesión (Wanner et al., 2013).

- **Formación cicatriz glial (días):** Desde 1 a 2 días después de la lesión, ciertos astrocitos reactivos inician una rápida proliferación y densa colonización del área alrededor del núcleo de la lesión, proceso que se extiende durante un período de 7 a 10 días hasta la formación completa de la cicatriz glial (Wanner et al., 2013). Esta proliferación alcanza su punto máximo entre los 3 y 5 días post-lesión, disminuye al séptimo día y prácticamente cesa al decimocuarto día. A lo largo de este proceso, los astrocitos gradualmente pierden sus dominios característicos y se compactan para formar un estrecho margen, constituido por solo algunas capas de células, que delimita la cicatriz glial (Herrmann et al., 2008; Wanner et al., 2013; Hara et al., 2017). Durante esta fase, los astrocitos duplican su capacidad proliferativa en comparación con su estado en la ME no lesionada. Además, responden a señales del núcleo de la lesión transformándose fenotípicamente en astrocitos formadores de cicatrices, lo cual explica el gradiente decreciente de proliferación y densidad de astrocitos a medida que se incrementa la distancia desde el núcleo de la lesión (Wanner et al., 2013).
- **Maduración de la cicatriz glial (semanas):** Desde 1 a 2 semanas hasta varias semanas después de la lesión, la cicatriz glial alcanza su completa madurez (Ren et al., 2017). En este punto, los astrocitos que forman la cicatriz terminan su transformación fenotípica, dejando de orientar sus procesos de manera perpendicular al núcleo de la lesión para disponerlos de forma paralela y superpuesta. Esto resulta en la pérdida total de sus dominios originales y en la formación de una cicatriz glial madura y densa (Wanner et al., 2013). Tras alcanzar esta etapa, la LM empieza a estabilizarse, dando paso a una prolongada fase crónica de regeneración.

1.2.3 Rol dual de la cicatriz glial

Se reconoce que la cicatriz glial tiene un papel dual en la LM, actuando tanto como protectora como inhibidora. Esta dualidad complica el enfoque terapéutico hacia la cicatriz glial y subraya la importancia de comprender su complejidad para optimizar las intervenciones (Fehlings et al., 2017; Yang et al., 2020). A continuación, se detallan ambos roles:

Rol inhibitorio:

- **Barrera Física:** Algunas observaciones tempranas mostraron que los axones en regeneración no logran crecer más allá de la cicatriz glial, lo que lleva a la hipótesis de que la cicatriz glial forma una barrera física que obstruye la regeneración axonal aunque sigue siendo controvertida (Sugar & Gerard, 1940; Brown & McCouch, 1947; Yang et al., 2020).
- **Presencia de moléculas inhibitorias:** Varias familias de moléculas presentes en la MEC previenen el crecimiento axonal, incluidos los CSPG, Nogo-A, glicoproteína asociada a mielina (MAG), efrinas y semaforinas (Yang et al., 2020;

Clifford et al., 2023; Schwab et al., 2014; McKeon et al., 1991; McKerracher & Rosen, 2015), pero también hay presencia de factores intrínsecos que limitan el crecimiento (Griffin et al., 2020). Los CSPG son los más relevantes, sintetizados tras la LM por astrocitos, OPC-Antígeno glial 2 (NG2), macrófagos y oligodendrocitos (McKeon et al., 1999; Asher et al., 2002; Jones et al., 2003; Tan et al., 2005).

- **Incremento inflamatorio:** Después de la LM, los astrocitos reactivos, la microglía y las células inmunes periféricas liberan citoquinas proinflamatorias e interactúan entre sí, lo que contribuye a la inflamación en la etapa aguda y subaguda (Escartin et al., 2019; Yang et al., 2020).
- **Fenotipo neurotóxico de los astrocitos reactivos:** Los astrocitos pueden pasar a fenotipos A1 (pro-inflamatorios) o A2 (anti-inflamatorios). Los astrocitos A1 se inducen en la fase aguda, pueden ser parte de los astrocitos formadores de cicatrices y contribuir a las funciones inhibitoras de la cicatriz glial (Liddel et al., 2017). La microglía reactiva libera citoquinas como la interleucina 1 alfa (IL-1 α), TNF y el componente del complemento 1q (C1q) para inducirlos. La poderosa neurotoxicidad de los astrocitos A1 es capaz de matar oligodendrocitos y neuronas *in vitro* (Wang L. et al., 2018; Yang et al., 2020).

Rol Beneficioso:

- **Equilibrio inflamatorio:** La cicatriz glial y los astrocitos reactivos no solo fomentan la inflamación, sino que también contribuyen al equilibrio de las actividades inflamatorias en las etapas aguda y subaguda de la LM evitando su propagación. Esto se obtiene a nivel espacial mediante la restricción de células inflamatorias y fibróticas, y a nivel molecular mediante la eliminación de desechos mediada por células inflamatorias, lo cual es esencial para la recuperación (Sofroniew, 2015; Yang et al., 2020).
- **Proporciona puentes para la regeneración neuronal:** Los astrocitos reactivos exhiben plasticidad dependiente del medio ambiente y podrían servir como puentes para el nuevo crecimiento axonal bajo ciertas condiciones. Esto podría deberse a que los axones crecen a lo largo de astrología inmadura recién proliferada, lo cual se corresponde con las propiedades de los astrocitos de la cicatriz glial (Mason et al., 1988; Raper & Mason, 2010; Wanner et al., 2013; Yang et al., 2020).

1.3 Estrategia de tratamientos

Las estrategias de tratamiento intentan enfocarse en disminuir los efectos negativos tras la LM, e incrementar los efectos positivos. Los objetivos en las estrategias terapéuticas de recuperación son: **1.** Reducción del daño secundario (neuroprotección); **2.** Reemplazo de células perdidas por daño primario y secundario; **3.** Remoción de moléculas inhibitoras; **4.** Regeneración para potenciar las respuestas reparadoras y regenerativas espontáneas; **5.** Remielinación de axones regenerados, reemplazados o preservados (desmielinizados); **6.** Reabastecimiento de soporte neurotrófico para mejorar la supervivencia neuronal y dirigir el crecimiento axonal y **7.** Estrategias de rehabilitación para inducir neuroplasticidad y/o moldear conexiones neuronales (**Figura 2**) (Griffin & Bradke, 2020).

1. **Neuroprotección:** Este enfoque se basa en la reducción de procesos inflamatorios. Se utilizan medicamentos como los antiinflamatorios no esteroides (AINE), y la minociclina para moderar la neuroinflamación (Simpson et al, 1991;

Stirling et al, 2004; Badhiwala et al, 2018). También se aplica el bloqueo de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) con magnesio para prevenir la excitotoxicidad del glutamato (Ditor et al, 2007), y la prevención de la apoptosis usando eritropoyetina (Baptiste & Fehlings, 2006). Sin embargo, dado que la neuroinflamación tiene efectos tanto beneficiosos como perjudiciales, la supresión de la inflamación de amplio espectro puede no ser eficaz y los agentes neuroprotectores aún no han sido efectivos clínicamente por sí solos por lo cual requieren combinarse con otros tratamientos (Griffin & Bradke, 2020).

2. **Reemplazo (terapia celular):** Esta línea de trabajo se focaliza en el trasplante de células de distintos orígenes al sitio de la LM para promover la regeneración y reparación. La eficacia del trasplante de células madre (SC) depende crucialmente de la metodología de administración utilizada. Las técnicas más comunes para implantar estas células incluyen las rutas intravenosa, intratecal e intramedular. Además, la cantidad de células trasplantadas varía según el método de administración seleccionado y la etapa específica de la LM en la que se encuentra el paciente (Silvestro et al., 2020; Griffin & Bradke, 2020) Se detallará en profundidad en el siguiente apartado.
3. **Remoción de moléculas inhibitoras:** Este enfoque terapéutico se centra en eliminar o neutralizar las moléculas que inhiben el crecimiento axonal después de una LM (Griffin & Bradke, 2020). Los targets más utilizados son:
 - CSPG:** Inicialmente, podría considerarse eliminar las células que producen CSPG. Sin embargo, dado que no existe un único tipo celular dominante que los produzca, los estudios sugieren que sería más efectivo apuntar directamente a los mismos CSPG o a sus receptores, en lugar de intentar atacar a los tipos de células que los producen (Yang et al., 2020). El uso de condroitinasa ABC (ChABC) ha demostrado ser eficaz para neutralizar los CSPG. Esta enzima derivada de *Proteus vulgaris*, cataliza la degradación de los enlaces glicosídicos de CSPG, liberando los glucosaminoglicanos (GAG) de la proteína central de CSPG. La administración de ChABC mediante vectores lentivirales ha mostrado promover la degradación a gran escala de CSPG y mejorar significativamente las funciones comportamentales después de una lesión torácica en ratas (Prabhakar et al., 2005a, 2005b; Bartus et al., 2014). Un vector lentiviral-ChABC inducible por doxiciclina ha permitido un control temporal sobre la expresión de ChABC, lo cual es una estrategia prometedora para su aplicación clínica (Burnside et al., 2018).
 - Xilosiltransferasa-1 (XT-1):** La XT-1 juega un papel crucial en la biosíntesis de CSPG. Reducir la expresión de XT-1 mediante la degradación catalítica del ARNm de XT-1 ha demostrado disminuir efectivamente los niveles de CSPG, facilitando así el crecimiento de los axones alrededor de lesiones en la columna dorsal de ratas (Grimpe & Silver, 2004; Hurtado et al., 2008).
 - NOGO-A:** NOGO-A es una de las proteínas asociadas a mielina con mayor efecto inhibitorio del SNC. El uso de anticuerpos anti-NOGO-A ha demostrado estimular el crecimiento axonal y la recuperación funcional. En particular, la combinación de estos anticuerpos con ChABC ha sido más efectiva que los tratamientos individuales, lo que destaca la ventaja de eliminar múltiples factores inhibidores para mejorar la recuperación después de una LM (Freund et al., 2009; Zhao et al., 2013).
4. **Regeneración: apuntar a mecanismos neuronales intrínsecos:** La capacidad de crecimiento intrínseca de las neuronas centrales disminuye a medida que la neurona se diferencia para funciones sinápticas (Hilton & Bradke, 2017). Esta es una de las principales razones por las que generan una respuesta regenerativa menor después de una lesión. Se sabe que para que un axón se regenere, se

requieren muchos mecanismos intracelulares diversos y coordinados. Estos incluyen la dinámica del citoesqueleto, el transporte y tráfico axonal, la señalización y transcripción de programas regenerativos y modificaciones epigenéticas (Curcio & Bradke, 2018; Fawcett & Verhaagen, 2018). Convertir estas intervenciones en alternativas clínicamente utilizables, como el uso de agentes farmacológicos o terapias genéticas con vectores virales, podría ser una vía prometedora para producir una respuesta regenerativa modesta (Curcio & Bradke, 2018). Otra estrategia sería modular la señalización intracelular mediante la modulación de guanosin trifosfato-asa (GTP) o la estabilización de los microtúbulos (Wu & Xu, 2016 ; Ruschel et al, 2015 ; Ruschel & Bradke, 2018).

5. **Reabastecimiento:** El tratamiento trófico se basa en el suministro de neurotrofinas (NTs), que son esenciales para la supervivencia, el desarrollo y la funcionalidad de las neuronas. Estas NTs, como el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), y el factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF), se pueden administrar directamente a la médula espinal lesionada a través de diferentes métodos. Estos métodos incluyen la infusión directa, el uso de biomateriales, terapia génica *ex vivo*, y la expresión mediante vectores virales (Houweling et al., 1998; Jakeman et al., 1998; Griffin & Bradke, 2020).
6. **Remielinización:** Después de la LM, se produce una muerte aguda generalizada de oligodendrocitos y una desmielinización de los axones y se predice que la remielinización podría ser importante para proteger los axones de una mayor degeneración y mejorar la conducción, pero es controvertido. Hay dos enfoques disponibles: el trasplante de células que puedan diferenciarse directamente en oligodendrocitos que sinteticen mielina, y promover el reclutamiento y la diferenciación de OPC endógenas (Norenberg et al, 2004; Nave, 2010a, 2010b; Almad et al., 2011)
7. **Rehabilitación:** Los enfoques de rehabilitación en modelos animales incluyen una variedad de actividades como el ejercicio físico, que puede ser tanto forzado como voluntario, y el enriquecimiento ambiental. Estos métodos varían desde estrategias más generales hasta técnicas más específicas y dirigidas (Griffin & Bradke, 2020).

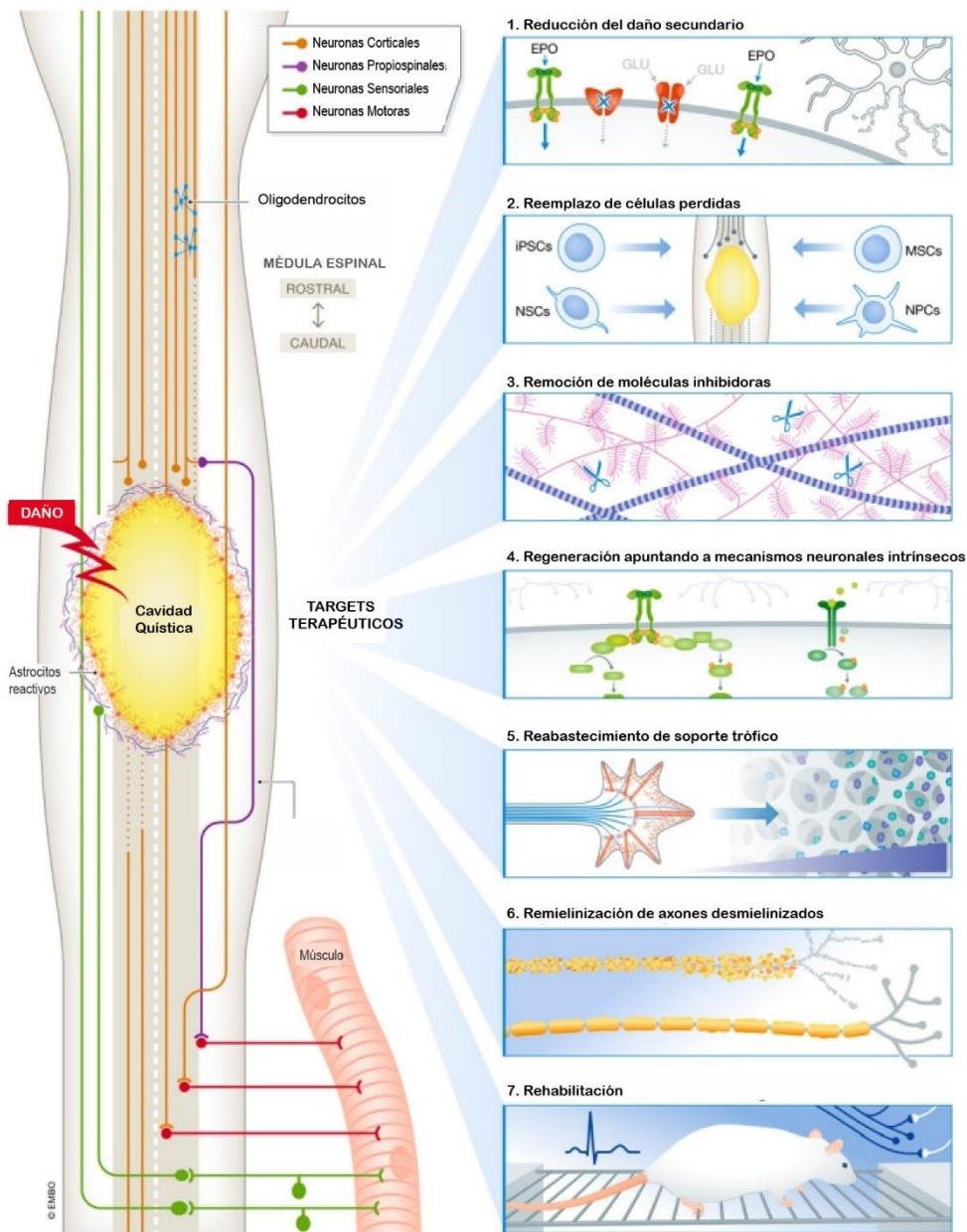


Figura 2. Estrategias de tratamiento para la LM. Las 7 dianas terapéuticas para tratar la LM están enfocados en: 1. Reducción del daño secundario; 2. Reemplazo de células perdidas; 3. Remoción de moléculas inhibitoras; 4. Regeneración apuntando a mecanismos neuronales intrínsecos; 5. Reabastecimiento de soporte trófico; 6. Remielinización de axones desmielinizados; 7. Rehabilitación. Adaptado de Griffin & Bradke, 2020.

Las estrategias combinadas han demostrado ser más efectivas que los tratamientos individuales en el abordaje de la compleja patología de la LM (Griffin & Bradke, 2020). Dado esto, a medida que esta práctica se generalice, la planificación y ejecución de los ensayos clínicos se volverán más complejas y deberán centrarse en la combinación de las mejores terapias disponibles para abordar la mayor cantidad de desafíos posibles asociados con la LM.

1.4 Terapia celular en la LM

Las terapias celulares representan una estrategia prometedora para el tratamiento de la lesión de la LM, ofreciendo potencial neuroprotector y regenerativo ejerciendo efectos pleiotrópicos (**Figura 3**) (Mothe & Tator, 2012). Se ha estudiado el trasplante de diferentes

tipos de células tanto a nivel preclínico como en ensayos clínicos mostrando cada una de ellas varios tipos de células, como las células madre mesenquimales (MSC), las células madre pluripotentes inducidas (iPSC), NPCs, las OPC, células madre hematopoyéticas (HSC), células madre embrionarias (ESC), precursores derivados de piel (SKP), y las células envoltantes olfativas (OEC), o incluso los exosomas derivados de SC, demostrando ser opciones viables para el tratamiento de la LM.

MSCs: Obtenidas de múltiples fuentes como la médula ósea (BM-MSC), el cordón umbilical (U-MSC) y el tejido adiposo (AD-MSC). Estas células son altamente valoradas en aplicaciones clínicas debido a su capacidad para secretar factores neurotróficos, su bajo perfil inmunogénico y sus propiedades inmunomoduladoras, facilitando la reparación y regeneración (Young et al., 1995; Laughlin et al., 2001; Arboleda et al., 2011; Keating, 2012).

ESCs: Pluripotentes y derivadas de la masa celular interna de blastocistos, las ESC pueden diferenciarse en casi todos los tipos de células, incluidas neuronas y células gliales. Su uso implica consideraciones éticas significativas y riesgos asociados con la tumorigénesis (Tator, 1995; Hulsebosch, 2002; Son et al., 2011).

iPSCs: Generadas por reprogramación de células somáticas, las iPSC evitan las cuestiones éticas vinculadas a las ESC y ofrecen una alternativa autóloga para terapias de reemplazo celular (Takahashi & Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007; Park et al., 2008).

Precusores derivados de la piel (SKPs): Autólogas y capaces de producir tanto descendencia mesodérmica como neuronas periféricas y células de Schwann, los SKPs ofrecen un entorno favorable para el crecimiento axonal post-lesión (Joannides et al., 2004; Biernaskie et al., 2007; Hu et al., 2010).

NPCs: Células multipotentes comprometidas al linaje neural diferenciándose en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, que pueden ser rápidamente expandidas *in vitro*. Razón por la cual este tipo celular será el utilizado en este estudio (Mothe & Tator, 2012).

HSCs: A pesar de su potencial para inducir recuperación funcional, las HSC enfrentan desafíos como la baja disponibilidad y riesgos de rechazo del injerto (Koshizuka et al., 2004; Koda et al., 2005).

OECs: Utilizadas para promover la remielinización y modulación del microambiente en lesiones del SNC, incluida la LME, con resultados prometedores en la mejora de la recuperación neurológica (Li et al., 2015; Gómez et al., 2018)

Por otra parte, también se utilizan exosomas derivados de SC que, si bien no son terapias celulares *per se*, se necesita del cultivo de alguno de los tipos celulares mencionados. Estos componentes celulares actúan como vectores de comunicación, transportando ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, y han demostrado ser efectivos en la modulación del microambiente de la lesión y en la promoción de procesos regenerativos (Tkach & Théry, 2016; Wang et al., 2019; Huang et al., 2021).

Estos enfoques multifacéticos no solo abordan los desafíos físicos de la LM, sino que también expanden los horizontes terapéuticos para la regeneración y reparación de lesiones en el SNC.

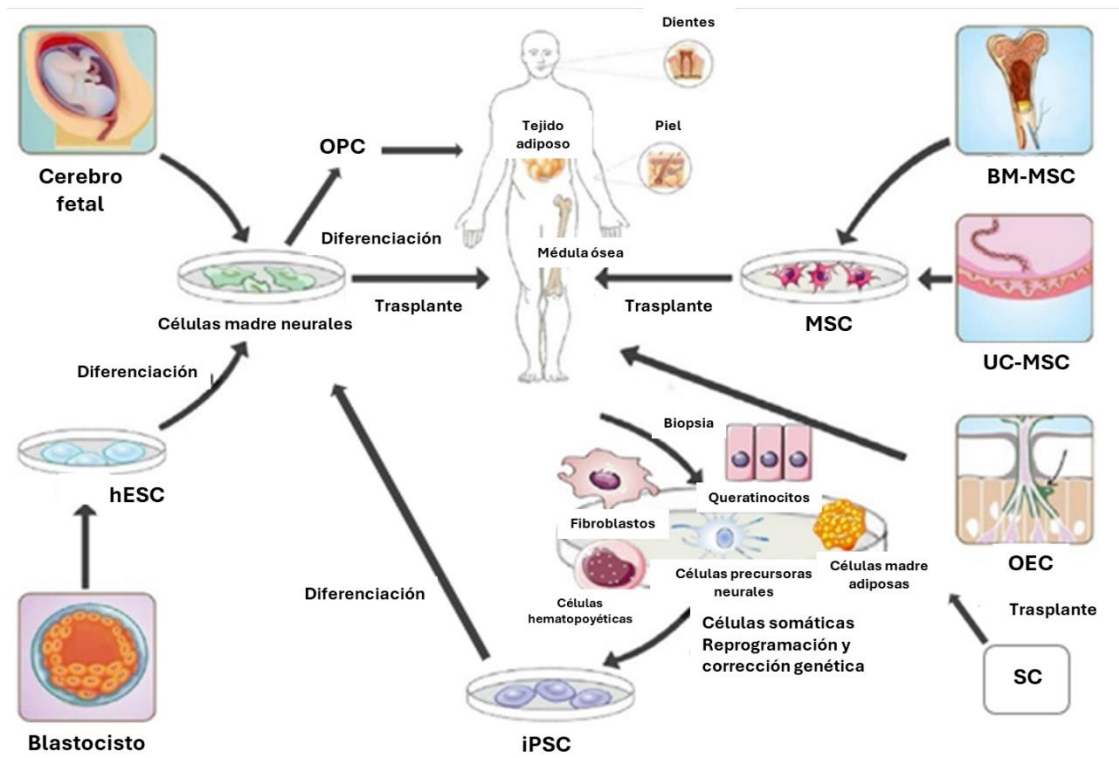


Figura 3. Planteamiento del trasplante celular y fuentes de obtención para los diferentes tipos celulares. SCs: Células madre; MSCs: Células madre mesenquimales; MB-MSCs: Células madre mesenquimales de médula ósea; U-MSCs: Células madre mesenquimales de cordón umbilical; AD-MSCs: Células madre mesenquimales de tejido adiposo; hESCs: Células madre embrionarias humanas; iPSCs: Células madre pluripotente inducidas; OPC: células precursoras de oligodendrocitos; NPCs: Células precursoras neurales; OECs: Células envoltantes olfativas. (Figura adaptada de FDA Health news, 2019).

1.4.1 NPCs en la terapia celular de LM

En la última década los mejores resultados terapéuticos provienen de trasplantes de NPCs fetales procedentes de la ME, destacando por su capacidad para reemplazar células del huésped, proporcionar apoyo trófico, modular la neuroinflamación y formar puentes sobre las lesiones, facilitando la reinstauración del circuito neuronal y la conectividad (Kadoya et al., 2016; Fischer et al., 2020; Giraldo et al., 2020). Estas células derivan de varias fuentes, incluyendo:

- **ME embrionaria:** Durante el desarrollo temprano, la ME alberga NPCs, que evolucionan hasta convertirse en progenitores de linaje restringido o hacia tipos celulares neuronales o gliales (Kalyani et al., 1998; Rao & Mayer-Proschel, 1997). Estas células pueden aislarse directamente de la ME de embriones de ratas de 13.5 días (Bonner et al., 2013).
- **ESCs e iPSCs:** Las técnicas avanzadas de biología regenerativa permiten la obtención de NPCs a partir de células ESCs e iPSCs mediante protocolos de diferenciación diseñados para generar progenitores neuronales específicos (Goulão & Lepore, 2016) y diversas poblaciones celulares como las interneuronas (White & Sakiyama-Elbert, 2019).

Por otra parte, su utilización tiene influencia positiva en los sistemas sensoriales y motores generando un entorno permisivo que facilita la supervivencia y diferenciación neuronal (Bonnet et al., 2011). Las NPCs permiten el crecimiento de axones del huésped dentro del injerto y la formación de conexiones sinápticas funcionales. Además, los trasplantes de NPCs en niveles altos de la ME pueden mejorar funciones autónomas, como la cardiovascular, mitigando condiciones como la disreflexia autonómica (Anderson, 2004; Krassioukov & Claydon, 2006) y mejorando el control de la vejiga (Lee et al., 2013). Sin embargo, a pesar de su potencial, la terapia con NPCs enfrenta desafíos como mejorar la supervivencia del injerto, dirigir la diferenciación de las NPCs hacia linajes neuronales deseados y establecer conexiones sinápticas funcionales (Fischer et al., 2020; Giraldo et al., 2020). Por ende, la investigación continua es vital para superar estos obstáculos y mejorar los resultados clínicos en pacientes con LM.

1.5 Optogenética

La optogenética es una técnica innovadora que combina la óptica y la genética para controlar la activación celular de manera precisa en tiempo (en escala de milisegundos) y espacio poblaciones celulares específicas superando métodos tradicionales como la estimulación eléctrica (Yizhar et al., 2011; Nectow & Nestler, 2020; Thompson et al., 2020). Esto permite tanto la ganancia como la pérdida de funciones celulares específicas (Deisseroth et al., 2006; Scanziani y Häusser, 2009; Deisseroth, 2010; Deisseroth, 2011).

En concreto, esta tecnología se basa en el uso de canales y bombas de iones sensibles a la luz para la activación o inhibición de neuronas, lo cual permite manipular *in vivo* la actividad neuronal. Esta técnica requiere de tres componentes: **(1)** Una proteína sensible a la luz (opsinas), **(2)** un mecanismo de entrega de luz a determinada longitud de onda, y **(3)** un mecanismo que genere la expresión de la opsina en el tipo celular específico. El mecanismo de funcionamiento es el siguiente: al iluminar la célula objetivo con la onda de luz específica, se activa la proteína fotosensible lo cual permite el paso selectivo de iones a través de la membrana celular, induciendo efectos de activación o inhibición (**Figura 4**). Las fuentes de emisión de luz más utilizadas son **(i)** amplificadores de luz por emisión estimulada de radiación (Láser), y **(ii)** diodos emisores de luz (LEDs). Los láseres son los más adecuados para integrarse en experimentos fisiológicos, ofreciendo una precisión y una intensidad de luz óptimas. Sin embargo, son más caros y complicados de ajustar (Aravanis et al., 2007; Adamantidis et al., 2007; Yizhar et al., 2011). Debido a su alta precisión y naturaleza mínimamente invasiva, la optogenética ha logrado resultados notables en el estudio de funciones y circuitos neuronales (Toettcher et al., 2013; Chen et al., 2022).

Por otra parte, el método más avanzado para lograr la expresión constitutiva de la opsina específica en células neuronales es la transducción basada en vectores virales (Naso et al., 2017). Entre los muchos tipos de vectores virales, el AAV es el método más empleado para aplicaciones optogenéticas. Y, de hecho, en humanos ya se está utilizando en el tejido neural para tratar trastornos de la visión (Bennett et al., 2016; Shen et al., 2020). Los AAV no integran consistentemente su ADN en el genoma del huésped, pero persisten episomalmente y se ha demostrado que conducen a una expresión genética prolongada con una toxicidad muy baja en varios tipos de células, incluidas las neuronas (Gil-Farina y Schmidt, 2016; Hordeaux et al., 2019; Bravo-Hernández et al., 2020).

Los desafíos de la optogenética incluyen la entrega de luz adecuada, donde el control sobre la longitud de onda, intensidad y duración de la luz son cruciales, y la respuesta de la

neurona depende de muchos factores, como las propiedades de la opsin expresada y el historial reciente de iluminación. Por lo tanto, al diseñar sistemas de suministro de luz para activar opsinas, el parámetro principal a medir y controlar es el flujo de fotones a nivel local (Shen et al., 2020).

1.5.1 Tipos de opsinas

Las opsinas son proteínas derivadas de varias especies microbianas que han sido rediseñadas para expresarse en mamíferos. Estas proteínas reaccionan a longitudes de onda específicas de luz, permitiendo el flujo o bombeo activo de iones a través de la membrana celular, lo que resulta en la activación o inhibición reversible de neuronas. Si bien las herramientas quimiogénicas, que son receptores que pueden activar o inhibir neuronas tras la unión de agonistas de pequeñas moléculas, también son relevantes, este trabajo se centrará en las opsinas (Magnus et al., 2019; Shen et al., 2020).

En la familia de las opsinas, se utilizan principalmente tres ramas en optogenética: bacteriorodopsinas, halorrodopsinas y canalrodopsinas (ChRs). Las bacteriorodopsinas naturales, que bombean protones fuera de la célula, y las halorrodopsinas, que bombean iones cloruro hacia la célula, suelen ser opsinas inhibitorias en sistemas neuronales porque estos tipos de corriente hiperpolarizante dificultan la generación de potenciales de acción. Por contraste, las ChRs naturales generalmente permiten que los iones cargados positivamente fluyan libremente a través del poro de la opsin, lo que las hace depolarizantes y excitatorias (Zang et al., 2011; Kelly et al., 2017; Deisseroth, 2015).

Algunos ejemplos específicos incluyen opsinas excitadoras, como la ChR2, e inhibitorias, como arqueorodopsina (ArchT) (Deisseroth, 2011), halorrodopsina (NpHR) (Boyden et al., 2005), y ChRs conductoras de cloruro (ChLoC) (Deisseroth, 2006). Estas herramientas ofrecen una amplia gama de espectros de activación y cinética, y algunas se han adaptado para manipular vías de señalización intracelular combinándolas con receptores acoplados a proteína G (OptoXR) (Grosenick et al., 2015; Deubner et al., 2019; Kelly et al., 2017) (**Figura 4**).

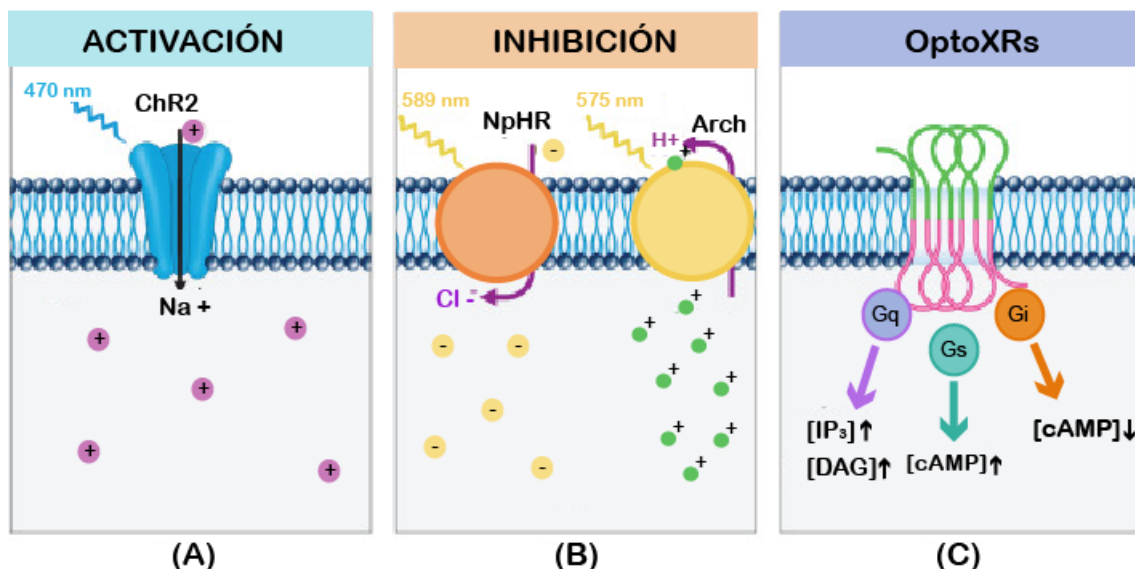


Figura 4. Funcionamiento de opsinas utilizadas en optogenética. La activación de la canalrodopsina-2 (ChR2) en respuesta a la luz con una longitud de onda de 470 nm da como resultado la entrada de iones de sodio (Na^+) y la despolarización celular (A). Halorrodopsina (NpHR) y la activación de Arqueorodopsina (Arch) en respuesta a la luz con una longitud de onda de 589 y 575 nm da como resultado la entrada de iones de cloruro y protones y la estabilización celular al reducir el potencial de membrana (B). OptoXR y transducción de señales intracelulares mediante el control de la concentración de mensajeros intracelulares, como el trifosfato de

inositol (IP3), el diacilglicerol (DAG) y la adenosina cíclica monofosfato (cAMP) en las células (C). Adaptado de Kelly et al., 2017.

El funcionamiento general de las ChRs consiste en la producción de un cambio conformacional en la proteína, debido a la aplicación de luz y la absorción de un fotón en el dominio opsina (Kato et al., 2012), cambio que determinará la apertura del dominio canal. El dominio opsina está relacionado con propiedades referentes a la absorción de luz mientras que el dominio canal se relaciona con las propiedades cinéticas del canal iónico (Deisseroth, 2015).

Determinados promotores fuertes, como el de citomegalovirus (CMV) o el Chicken β -actin (CAG), pueden expresar opsinas a niveles muy altos, lo que puede causar acumulaciones de proteínas o anomalías estructurales en las células objetivo con el tiempo. Aunque la expresión a muy largo plazo de cualquier proteína de membrana con promotores de fuerza moderada puede causar toxicidad, la fuerza y el tiempo de expresión interactúan para dar lugar a este fenómeno. Algunas proteínas fluorescentes como mCherry, comúnmente fusionadas a las opsinas, pueden agruparse y acumularse sin afectar necesariamente la función de las opsinas o la salud celular (Adamantidis et al., 2007; Yizhar et al., 2011).

Con los años, se han descubierto más variantes en estas familias de proteínas en la naturaleza o se han ingenierizado en el laboratorio para tener cinéticas más rápidas, propiedades biestables, conductancias iónicas alteradas y propiedades de respuesta de color modificadas; esta diversidad ahora se aprovecha de manera efectiva en experimentación optogenética (Deisseroth, 2015).

1.5.2 Aplicación de la optogenética al tratamiento de la LM

La utilización de la activación celular por optogenética ha sido utilizada en diferentes enfoques para tratar la LM, desde la activación selectiva de las neuronas de glutamato en la corteza motora primaria, hasta la inyección de un vector viral optogenético específico de neurona (Deng et al., 2021; Mondello et al., 2023).

Por otra parte, investigaciones previas de nuestro laboratorio han probado la estimulación optogenética de NPCs portadoras de vectores de opsinas para su posterior trasplante en modelos de animal con LM. La dirección de dichos tratamientos ha demostrado resultados positivos como el crecimiento axónico, la supervivencia, proliferación, y diferenciación celular (Giraldo et al., 2021). Además, actualmente otras investigaciones se enfocan en la activación química de las ChR2, donde la adición de un sustrato químico genera la emisión de luz por parte de una proteína luminiscente que activa el canal, y se ha demostrado que este sistema también activa la expresión de células neuronales y podría tener efectos positivos en la LM (Petersen et al., 2022).

Estas evidencias enfatizan el potencial regenerativo que ofrece el enfoque optogenético en terapias basadas en NPCs para la LM y destaca la necesidad de comprender más su funcionamiento para la traslación a la clínica.

1.6 Corolario de la Introducción

- **Importancia de la ME en el SNC:** La ME es fundamental en la coordinación de las funciones sensoriales y motoras entre el cuerpo y el cerebro, facilitando un flujo de información esencial para la movilidad y sensibilidad corporal. Su estructura única, compuesta principalmente de materia gris y blanca, la hace especialmente susceptible a diversas lesiones.
- **Impacto y prevalencia de la LM:** Con millones de personas afectadas a nivel global, la LM representa un desafío significativo en salud pública. Los altos costes

de atención y la complejidad en el manejo de sus secuelas reflejan la urgencia de desarrollar intervenciones más efectivas y accesibles.

- **Complicaciones y fases de la LM:** El daño a la ME no solo implica una disrupción inmediata de la transmisión neural, sino que también desencadena una serie de reacciones secundarias que pueden prolongar y agravar el daño inicial. La comprensión de las fases aguda, subaguda y crónica de estas lesiones es crucial para el desarrollo de estrategias terapéuticas efectivas.
- **Desafíos en la regeneración y recuperación:** La formación de cicatrices gliales y la presencia de un ambiente inhibitorio en el sitio de la lesión dificultan la regeneración neuronal. Esto subraya la necesidad de estrategias que no solo aborden la eliminación de barreras físicas y químicas, sino también que promuevan un entorno regenerativo.
- **Promesa de las estrategias de tratamiento avanzadas:** Mientras que las estrategias convencionales han mostrado limitaciones, enfoques innovadores como la terapia celular y la optogenética ofrecen nuevas esperanzas. Estos métodos podrían facilitar la reparación y regeneración de tejidos mediante el aprovechamiento de tecnologías que permiten un control más preciso sobre los procesos celulares y moleculares involucrados.
- **Retos específicos de la terapia con NPCs:** A pesar del considerable potencial de la terapia celular utilizando NPCs para tratar la LM, existen desafíos significativos que deben superarse, como mejorar la supervivencia del injerto, dirigir efectivamente la diferenciación de las NPCs hacia linajes neuronales deseados y establecer conexiones sinápticas funcionales.

2. OBJETIVOS

La hipótesis en la que se basa este trabajo es que la estimulación optogenética de NPCs *in vitro* en el contexto de la terapia celular para el tratamiento de la LM podría mejorar sus capacidades neuroregenerativas a través de la modulación de eventos celulares y moleculares en estas células y su efecto paracrino sobre las propias células de la ME.

En consecuencia, el objetivo principal de este trabajo es estudiar el efecto de la estimulación optogenética *in vitro* en NPCs fetales y su papel en la activación de los astrocitos. Los objetivos particulares incluyen:

1. Evaluar la capacidad de activación de NPC-ChR2 en respuesta a la estimulación optogenética con un sistema LED.
2. Evaluar el efecto de la estimulación optogenética sobre la diferenciación espontánea de las NPC en neuronas, oligodendrocitos y astrocitos.
3. Evaluar el efecto de la estimulación optogenética sobre el fenotipo de astrocitos diferenciados a partir de NPC estimulados.
4. Evaluar el efecto paracrino de la estimulación optogenética de NPC-ChR2 sobre la activación de astrocitos maduros procedentes de médula espinal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estimulación optogenética

La estimulación optogenética se realizó con luz azul (BL) LED a 470 nm. Se utilizó un dispositivo controlado por aplicación móvil diseñado por el grupo de biosensores de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Los parámetros de estimulación consistieron en ciclos de 100 pulsos de 90 ms on y 10 ms off a 10 de intensidad. Cada ciclo se repitió 3 veces con 10 segundos de descanso entre cada uno (**Figura 5**). Además, las células se estimularon 2 o 3 veces al día (detallado en cada diseño experimental).



Figura 5. Parámetros de estimulación optogenética celular con el dispositivo LED. Se realizaron 3 ciclos de estimulación con 10s entre cada uno. Cada ciclo consistió en una intensidad de 10 y 100 pulsos 90 ms on y 10 ms off a 470 nm.

3.2 Obtención y mantenimiento de NPCs

3.2.1 Obtención del cultivo primario y criopreservación

Las NPCs se obtuvieron a partir de médulas espinales de embriones de 13.5 días de ratas WT. Para ello, se diseccionaron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12 (DMEM/F12; Gibco, EE. UU.) suplementado con penicilina y estreptomina (P/S) y el tejido fue disociado mecánicamente mediante microdissección y posterior pipeteo. Seguidamente, las NPCs fueron aisladas y cultivadas como neuroesferas en el medio NeuroCult Proliferation Medium (Stemcell Technologies, Francia) suplementado con NeuroCult Proliferation Supplement (Stemcell Technologies, Francia), 100 U/ml de penicilina (P) (Sigma, Francia), 100 µg/ml de estreptomina (S) (Sigma, Francia), 0,7 U/ml de heparina (Sigma, Francia), 20 ng/ml de EGF (Thermo Fisher, UK) y 20 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; Invitrogen, UK) en placas P6 estériles multipocillo para cultivo celular (Avantor delivered by VWR, EE.UU.) previamente tratadas con solución antiadherente (STEMCELL TECHNOLOGIES, Canadá). Finalmente, el cultivo primario obtenido se incubó a 37°C y 5% de CO₂ y se monitorizó diariamente empleando un microscopio invertido, o bien se congelaron en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización mediante centrifugado 5 minutos a 300 fuerza centrífuga relativa (rcf), extracción del sobrenadante y posterior suspensión celular en 90% de suero fetal bovino (FBS) (Merck, Alemania) y 10% dimetilsufóxido (DMSO) (SIGMA-ALDRICH, Merck Group, EE.UU.) (**Figura 6**).

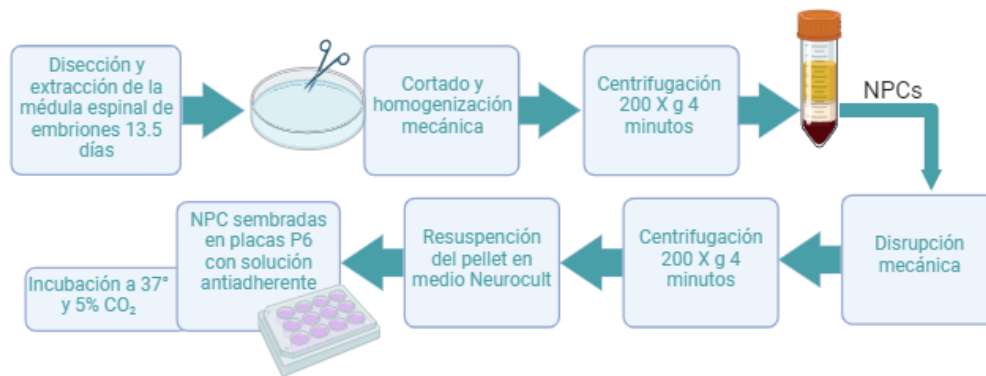


Figura 6. Protocolo de extracción de NPCs de embriones de rata de 13.5 días.

3.2.2 Pasaje, disgregado y mantenimiento

Para asegurar la llegada de nutrientes al centro de las neuroesferas y evitar la muerte celular, una vez alcanzaba gran tamaño se generaba el disgregado y pasaje del cultivo. Las neuroesferas se disociaron con acutasa (A1110501; Gibco, EE. UU.), y se sembraron en nuevas placas P6 con medio Neurocult 20 ng/ml de EGF (Thermo Fisher, UK) y 20 ng/ml de FGF (bFGF; Invitrogen, UK). Para el descongelamiento de las NPCs se diluyó el medio de congelamiento con medio DMEM/F12, se centrifugó 5 minutos a 300 rcf, se extrajo el sobrenadante y resuspendió en medio Neurocult más factores (EGF y FGF) para su posterior sembrado en placas P6 o P24 (**Figura 7**).

3.2.3 Transducción viral

La expresión ectópica de hChr2-mCherry se consiguió mediante un vector adenoasociado de serotipo 9 (AAV9) generado a partir del constructo viral pAAV.CAG.hChr2(H134R)-mCherry.WPRE.SV40 (Addgene viral prep #100054-AAV9; <http://n2t.net/addgene:100054>; RRID: Addgene 100054); y la expresión ectópica de Tdtomato mediante un AAV9 generado a partir del constructo viral pAAV.CAG.tdtomato (Addgene viral prep #59462). El Chr2 utilizado porta una mutación sin sentido H134R que induce fotocorrientes más grandes tras la estimulación en comparación con el Chr2 de tipo salvaje. Para llevar a cabo la transducción de las NPCs, las neuroesferas se disociaron con acutasa (A1110501; Gibco, EE. UU.), se suspendieron en 200 µl de medio de cultivo con una multiplicidad de infección de (1x10⁵ unidades de transducción/célula) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. A continuación, las NPCs se depositaron de nuevo en las placas multipocillo P6 estériles y se dejaron crecer durante una semana en las mismas condiciones explicadas anteriormente para la formación de neuroesferas (**Figura 7**).

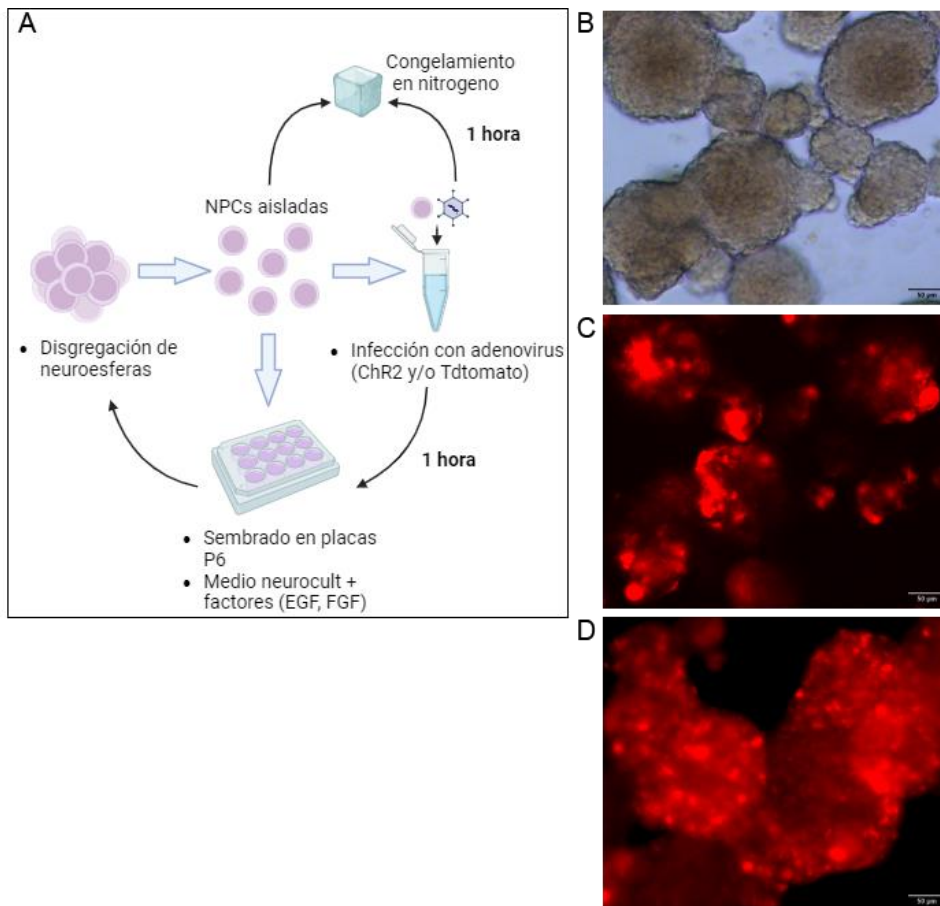


Figura 7. Transducción viral NPCs. Protocolo de transducción de Chr2 y Tdtomato con adenovirus (A). NPCs formando neuroesferas (B); NPCs-Chr2 en microscopio de fluorescencia observándose la expresión de la Chr2 en las NPCs obtenidas (C); NPCs-tdtomato en microscopio de fluorescencia observándose la expresión de la Tdtomato en las NPCs obtenidas (D). Imágenes tomadas a 20X; barra de escala: 50 µm.

3.2.4 Protocolo de diferenciación

Para inducir la diferenciación de las NPC-Chr2 se sembraron 70.000 células individuales previamente tratadas con acutasa, en pocillos de una placa P24 sobre covers tratados con Matrigel® con una dilución 1/15 para su adhesión a la superficie (Corning, EE.UU.) con medio DMEM/F12 suplementado con P/S. El protocolo consistió en 7 días donde del día 0 al día 3 las NPCs se mantuvieron en 700 ul de medio de proliferación que consistió en DMEM/F12 suplementado con Heparina 5µg/ml; NaHCO₃ 0.125%; Glucosa 0.6%; P/S 1X; L-Glutamina 1X; Insulina 25µg/ml; BSA 4µg/ml, Heparina 0.7µg/ml, 0.04% FGF y Hormona Mix 10X (compuesta por DMEM/F12 suplementado con 0.4% HEPES, 1.2% NaHCO₃, 1.6% glucosa, 0.008% progesterona, 0.024% sodium selenite, 0.064% apotransferrina and 0.1% putrescine). Las células fueron incubadas a 37° y 5% CO₂. Al día 3 el medio de proliferación se reemplazó por 700 ul de medio de diferenciación por pocillo compuesto de DMEM/F12 suplementado con Heparina 5µg/ml; NaHCO₃ 0.125%; Glucosa 0.6%; P/S 1X; L-Glutamina 1X; Hormona Mix 10X; Insulina 25µg/ml y 2% Suero fetal bovino (FBS, Thermo Fisher). El medio de diferenciación únicamente se cambió el 50% cada 2-3 días. A partir de este día y hasta el final del experimento (días 3-7), se realizó la foto-estimulación con BL a 470nm a los pocillos correspondientes o bien con el dispositivo láser 1 vez al día, o bien con el dispositivo LED 2 veces al día. Tras la última estimulación, las células fueron finalmente fijadas y procesadas para la tinción de inmunofluorescencia celular (**Figura 8**).

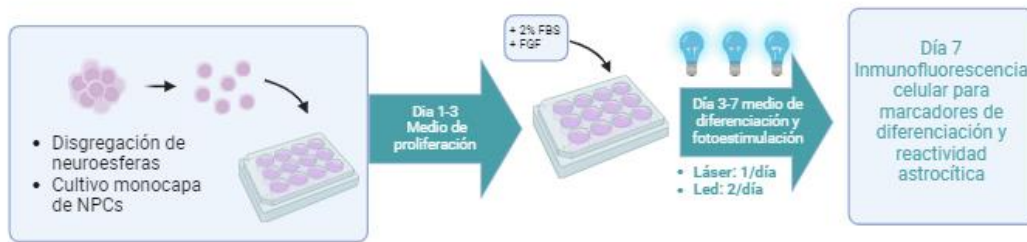


Figura 8. Protocolo de diferenciación de NPCs. FBS: suero fetal bovino; FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

3.2.5 Determinación de la activación de NPCs estimuladas optogenéticamente

Con el fin de determinar la activación de NPCs tras la estimulación, se evaluó la concentración del proto-oncogen Fos (c-Fos) en el tiempo. Para esto, se procedió a sembrar 70.000 NPCs en cada pocillo P24 sobre un cover previamente tratado con una dilución 1/15 de Matrigel® (Corning, EE.UU.). Las NPCs expresaban ectópicamente o bien Chr2, o Tdtomato (NPCs control). Se estimularon durante un día con el dispositivo LED 1, 2 o 3 veces y se obtuvieron 2 réplicas quedando los siguientes 8 grupos experimentales formados:

- NPC-ChR2 Control
- NPC-ChR2 1 estimulación
- NPC-ChR2 2 estimulaciones
- NPC-ChR2 3 estimulaciones
- NPC-Tdtomato Control
- NPC-Tdtomato 1 estimulación
- NPC-Tdtomato 2 estimulaciones
- NPC-Tdtomato 3 estimulaciones

Finalmente, cada grupo se fijó tras su número de estimulación correspondiente en paraformaldehído (PFA) 4% para el análisis de inmunofluorescencia celular. Los controles se fijaron tras la tercera estimulación del día (**Figura 9**).

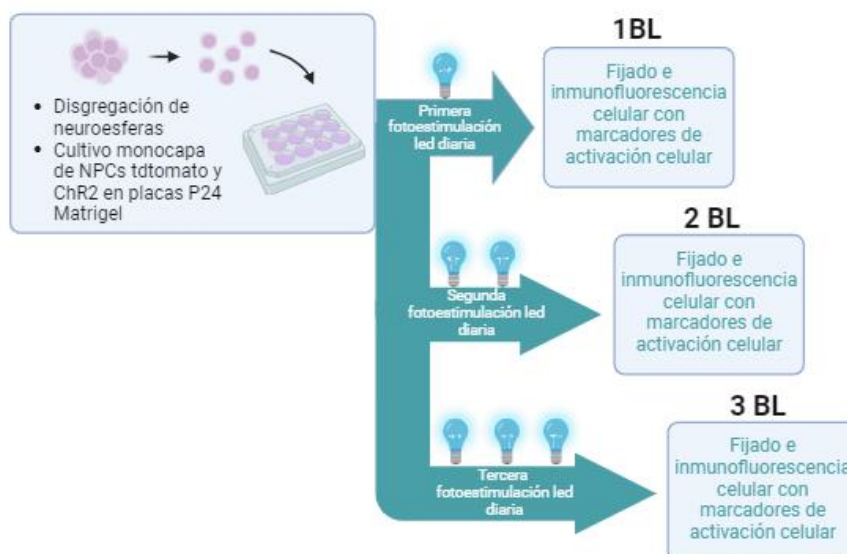


Figura 9. Diseño de experimento c-Fos. BL: Blue light (470 nm); NPC: Células precursoras neurales.

3.3 Obtención y cultivo primario de astrocitos procedentes de médula espinal

Para la obtención del cultivo primario astrocítico se modificó levemente el protocolo de Kerstetter, A. E., & Miller, R. H. (2012). Los astrocitos se obtuvieron a partir de MEs de ratas WT postnatales entre los estadíos P1-P3. Para ello, se diseccionaron en medio DMEM/F12 suplementado con P/S en una Placa Petri para cultivo celular 100 mm X 20 mm (A20167 Corning, EE.UU.). El tejido fue disociado mecánicamente mediante microdissección con tijeras y posterior pipeteo, seguidamente de una digestión enzimática con 0.05% tripsina-EDTA (1X) (Termofisher, UK). Se filtraron en una malla de 40 μm (Sigma-Aldrich, EE.UU.) con medio DMEM-HighGlucose suplementado con 100 U/ml de P, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de S, Glutamax 100X (1%, 10860311, Gibco, EE.UU.) y 20% FBS. El día 1 se sembraron en un Flask de 75 cm^2 (Corning, EE.UU.) previamente tratado con Poly-L-lisina (PLL, P2636, Milipore Sigma, EE.UU.) y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24hs para la adherencia celular. Pasado este tiempo el flask se mantuvo en agitación durante la noche a 200 rpm y 37°C en el mismo medio y se cambió al día 2, 4 y 7 reduciendo el FBS al 10%. Se cambió el medio cada 2 días hasta llegar al 100% de confluencia donde se levantaron con tripsina 15 minutos en el incubador, y se replaquearon en placas de cultivo multipocillo P6 tratadas con PLL y medio DMEM-HighGlucose 10% FBS (**Figura 10 A**). Se sembraron astrocitos a baja densidad para evaluar la pureza celular obteniendo un 80% de contenido astrocítico (**Figura 10 B, C**). Para su criopreservación se siguió el mismo protocolo que con las NPCs descrito anteriormente.

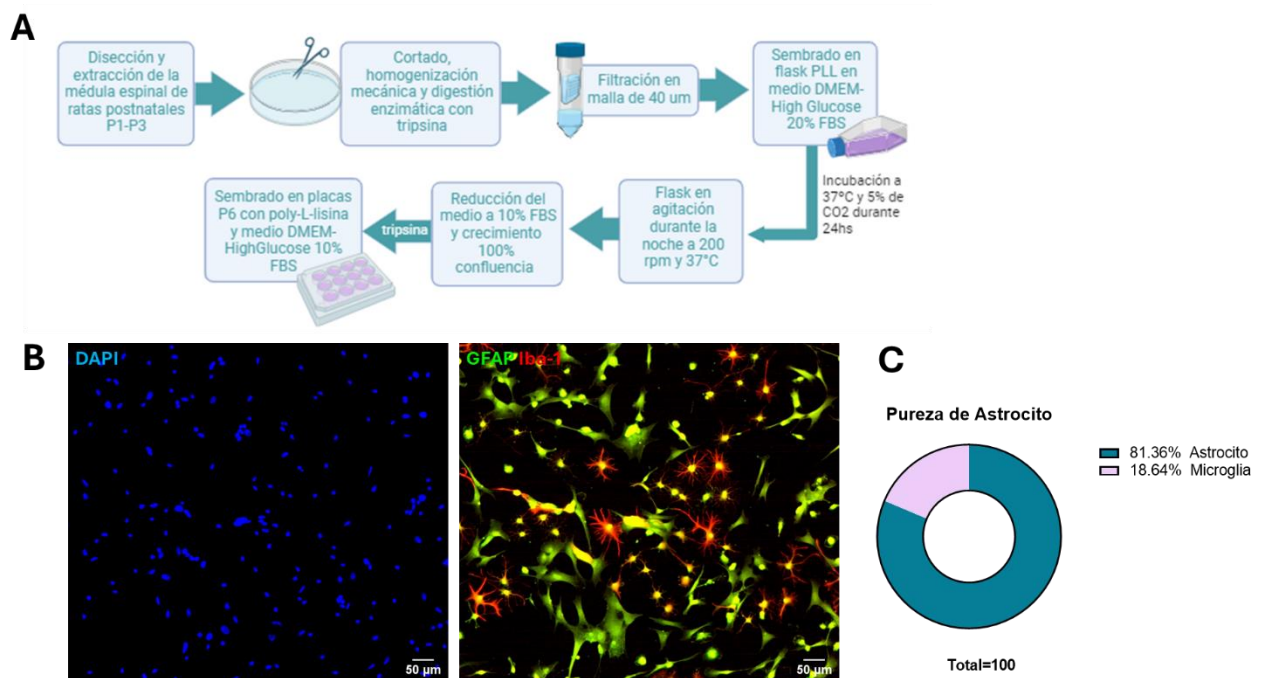


Figura 10. Cultivo primario de astrocitos maduros a partir de ME de ratas postnatales. (A) Protocolo de extracción de astrocitos de ratas postnatales P1-P3. (B) Inmunofluorescencia de GFAP (marcador astrocítico), Iba-1 (marcador microglía y macrófagos) y DAPI del cultivo primario de astrocito (C) Pureza de astrocito obtenida. Se cuantificó el porcentaje de células positivas para cada marcador (GFAP o Iba-1) sobre el total de las células. N= 2. Imágenes tomadas con microscopio de fluorescencia a un aumento 10X.

3.3.1 Mantenimiento del cultivo primario de astrocitos de ME

Para el mantenimiento del cultivo primario de astrocitos se cultivaron con medio DMEM-HighGlucose 10% FBS y se cambió cada 2 días. Para el descongelado se siguió el mismo protocolo que para las NPC descrito en el apartado anterior a excepción de que las células se resuspendieron en medio DMEM High-Glucose 10% FBS para su posterior sembrado en placas de 6 multipocillos.

3.4 Cocultivo NPCs-Astrocitos

Para el experimento de cocultivo se sembraron en el medio DMEM-HighGlucose 10% FBS, descrito anteriormente, astrocitos en placas P6 previamente tratadas con Matrigel® en una dilución 1/15 (Corning, EE.UU.) para favorecer la adhesión celular. Se sembraron ~100.000 células para los estudios de qPCR y ~50.000 para inmunofluorescencia. Para evaluar la influencia de las NPCs-ChR2 estimuladas con BL sobre los astrocitos, se colocaron *inserts* de cultivo celular 0.4 µm (Merck, Germany 20284892) sobre los astrocitos en medio Neurocult. Se llevó a cabo estimulación optogenética de los NPC-ChR2 con el dispositivo LED durante 3 días y se estimuló 2 veces al día. Para inducir un ambiente inflamatorio y activar a los astrocitos se añadió lipopolisacárido (LPS) 1 µg/mL (día 2). Finalmente, a partir del ensayo de cocultivo se obtuvieron muestras de astrocitos para estudiar marcadores de reactividad mediante ensayos de inmunofluorescencia y qPCR (**Figura 11**).

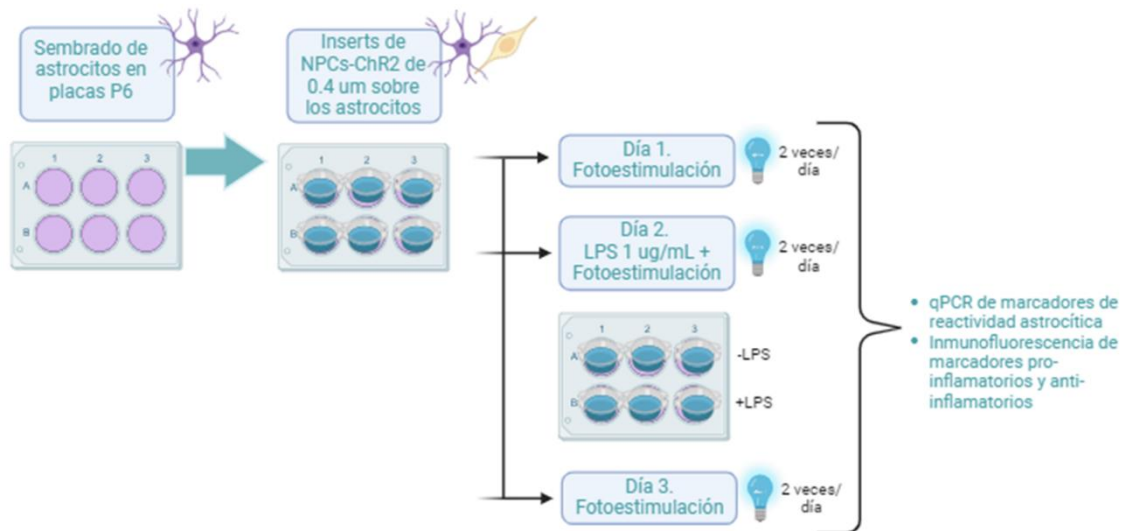


Figura 11. Diseño de experimento de Cocultivo NPCs-Astrocitos. BL: Blue light (470 nm); NPC: Células precursoras neurales.

3.5 Inmunofluorescencia celular

Para realizar los diversos ensayos de inmunocitoquímica, los cultivos en adherencia de astrocitos y NPCs se fijaron con PFA frío al 4% durante 15 minutos seguido de 3 lavados con tampón fosfato salino (PBS) 1X. Para la permeabilización de las membranas celulares y el bloqueo de la unión inespecífica del anticuerpo se utilizó una solución de bloqueo que contiene 94,8% PBS, 5% *normal goat serum* (NGS) y 0,2% Tritón (Sigma). Esta solución de bloqueo se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo se añadió la solución correspondiente de anticuerpos primarios. Los anticuerpos primarios (**Tabla 1**) fueron diluidos en una disolución de bloqueo formada por 99,8% PBS, 0,2% Tritón (Sigma) y 0,1 g Albúmina de Suero Bovino (BSA) y se incubaron toda la noche en una cámara fría a 4 °C con una adecuada cámara de humedad para evitar la evaporación.

Al día siguiente, se llevaron a cabo 3 lavados de 5 minutos con PBS 1x para posteriormente incubar 1 hora con la solución de anticuerpos secundarios correspondientes detallados en la **Tabla 2**. Tras la incubación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1x y se incubó con una dilución 1/1000 de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma Aldrich, EE. UU.) en PBS 1x durante 5 minutos con el fin de marcar los núcleos celulares. Por último, se montaron los cubres sobre portas con Moviol (Sigma Aldrich, EE.UU.).

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en las reacciones de inmunofluorescencia celular

Anticuerpo Primario	Marcaje	Dilución
IBA-1 Goat (ab5076; Abcam)	Microglía/Macrófagos	1/200
GFAP Rabbit (z0334; Agilent)	Marcador astrocitos	1/800
GFAP Chicken policlonal (PA1-10004; Invitrogen)	Marcador astrocitos	1/800
Nestina mouse (ab6142; Abcam)	Marcador neuronas	1/500
C-fos Rabbit (ab190289; Abcam)	Marcador nuclear células activadas	1/500
RFP pig (390004; Synaptic System)	Marcador de expresión ectópica de ChR2 o Tdtomato	1/1000
b-III tubulina mouse (ab78078; Abcam)	Marcador citoesqueleto neuronal	1/400
Olig2 Rabbit (Ab9610; (milipore corp.; Merck)	Marcador oligodendrocitos	1/400
Arginasa mouse (sc-271430; Santa Cruz Biotechnology)	Marcador anti-inflamatorio	1/400
phospho-NF-κB p65 Rabbit (MA5-15160; Invitrogen)	Marcador nuclear de reactividad Astrocítica	1/500
C3 rabbit (PA5-21349; Invitrogen)	Reactividad Astrocítica	1/200

Tabla 2. Anticuerpos secundarios empleados en las reacciones de inmunofluorescencia celular

Anticuerpo Secundario	Dilución
α-goat 555 (A21432; Invitrogen)	1/500
α-rabbit 647 (A21244; Invitrogen)	1/500
α-rabbit 555 (A21428; Invitrogen)	1/400
α-mouse 488 (A11001; Invitrogen)	1/500
α-mouse 555 (A21422; Invitrogen)	1/400
α-pig 555 (A21435; Invitrogen)	1/400
α-pig 647 (A21450; Invitrogen)	1/400
α-chicken 647 (A21449; Invitrogen)	1/400
α-chicken 488 (A11039; Invitrogen)	1/400

3.6 Extracción de ARN, retro-transcripción y qPCR

La extracción de ARN de los cultivos celulares se realizó según el método estándar Trizol y luego se sometió a un paso adicional de limpieza mediante RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen, Alemania) para garantizar la calidad de la muestra ($A_{260}/A_{280} \approx 2$ y $A_{260}/A_{230} \geq 1,8$). Se transcribió 1µg de ARN total mediante transcripción inversa utilizando el kit RNA-to-cDNA™ de alta capacidad (Applied Biosystems, Massachusetts, EE. UU.) en una reacción de 30 minutos a 42 °C. Se diseñaron cebadores específicos para cada gen de interés (**Tabla 3**) utilizando el cebador-BLAST (NCBI, Maryland, EE. UU.) y se evaluaron mediante el rendimiento de la curva de eficiencia. La qPCR se realizó por triplicado utilizando AceQ SYBR qPCR Master Mix (ThermoFisher) en el sistema de detección Light-Cycler 480 (Roche, Basilea, Suiza). Los datos de Ct se obtuvieron con el software de cuantificación relativa LightCycler 480 (Roche, Basel, Suiza).

El nivel de ARNm de GAPDH se utilizó como control interno para la normalización. Los cambios en la expresión con respecto a las muestras de control se calcularon como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabla 3. Primers de ARN forward y reverse empleados en las reacciones de qPCR

ARN	Forward primer 5´ - 3´	Reverse primer 5´ - 3´	TM	[]
<i>LCN2</i>	CAGCGAATGCGGTCCAGAAA	CTGTATCTGAGGGTAGCTGTGAA	58.3°C; 55.8 °C	100 µM
<i>SerpinA3n</i>	CTTGCAACCAGAGACCCTGA	GCCTTGTGGACCACCTGAG	57 °C; 58.3 °C	100 µM
<i>IL-1β</i>	TAGCAGCTTTTCGACAGTGAGG	CTCCACGGGCAAGACATAGG	56.9 °C; 57.7 °C	100 µM
<i>IL-6</i>	AGAGACTTCCAGCCAGTTGC	TGCCATTGCACAACCTCTTTTC	57.3 °C; 54.3 °C	100 µM
<i>CXCL10</i>	TCTGAGTGGGACTCAAGGGAT	AGACCTTCTTTGGCTCACCG	57.3 °C; 57.3 °C	100 µM

3.7 Análisis de imagen

Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio vertical de fluorescencia (DM6000B, Leica), tomando 8-10 campos por portaobjeto. Posteriormente se analizaron en ImageJ siguiendo el siguiente flujo de trabajo para cada uno de los objetivos. Cabe aclarar que todas las cuantificaciones celulares presentes, así como las colocalizaciones, se contaron empleando la herramienta “*Cell Counter*”:

- Para evaluar la activación de las células mediante la expresión de c-Fos se creó una máscara en los DAPIs y luego se cuantificó la intensidad de la señal en el núcleo celular superponiendo dichas máscaras sobre el marcaje c-Fos. Luego, asumiendo la existencia de activación celular basal, se tomó como límite de activación celular todo valor por encima del promedio del valor más alto y el valor más bajo y se co-localizaron dichas células con el marcaje mCherry para su cuantificación. Además, se obtuvieron los valores totales de células con cada marcaje por separado (DAPI, mCherry y c-Fos).
- Para el análisis de diferenciación celular, se calculó la proporción de NPCs positivas para βIII-tubulina (neuronas), Factor de transcripción de oligodendrocitos 2 (Olig2); (oligodendrocitos) y GFAP (astrocitos) sobre el total de células para cada imagen adquirida utilizando la función *Cell Counter* de ImageJ. Además, la tinción de GFAP se utilizó para distinguir y cuantificar diferentes morfologías de astrocitos.
- Para evaluar la reactividad astrocítica de NPCs-ChR2 diferenciadas a astrocitos, se combinó la imagen de cada uno de los marcajes con la señal de DAPI para contar el número de células positivas para GFAP, mCherry, arginasa y NFκB y con otro de los marcadores en caso de querer detectar co-localización.
- Para evaluar reactividad astrocítica en el cocultivo, se combinó la imagen de cada uno de los marcajes con la señal de DAPI para contar el número de células positivas para GFAP, mCherry, arginasa y NFκB y con otro de los marcadores en caso de querer detectar co-localización. En los *inserts* de NPCs se utilizó el marcador de Nestina para observar la presencia y distribución de dichas células.

- Para evaluar pureza de cultivo se co-localizaron la molécula adaptadora de unión al calcio (Ca²⁺) ionizado 1 (Iba-1) y GFAP para cuantificar células GFAP o Iba-1 positivas.

3.8 Análisis Estadístico

Finalmente, los resultados se ilustraron en gráficas y fueron analizados estadísticamente mediante el software GraphPad Prism versión 8.0.2. En primer lugar, para estudiar si los datos seguían una distribución normal, se empleó el test de Shapiro-Wilk. Seguidamente, para llevar a cabo las comparaciones múltiples, en caso de que los datos siguieran una distribución normal, se empleó un análisis ordinary one-way ANOVA paramétrico seguido del test post-hoc de Bonferroni el cual permitió establecer las diferencias entre grupos. Por el contrario, si los datos no se ajustaban a una distribución gaussiana, las comparaciones múltiples se realizaron mediante un análisis ordinary one-way ANOVA no paramétrico seguido del test post-hoc de Kruskal-Wallis. Asimismo, para comparar diferencias entre dos grupos se realizó un t-test. Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM) y las diferencias fueron consideradas como significativas si el p-value $< 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio del funcionamiento in vitro del mecanismo de estimulación optogenética

4.1.1 La eficiencia de transducción de ChR2 y Tdtomato en NPCs varía entre ellas, y es baja en ambas

Para evaluar el estado de activación de las NPC-ChR2 tras la estimulación optogenética se utilizó como control no solo la ausencia de estimulación, sino también NPCs que expresan ectópicamente Tdtomato pero que no inducen la apertura de un canal iónico con la luz azul a 470nm. Se evaluó en primer lugar la eficiencia de la infección tanto de ChR2 como de Tdtomato. Para esto se realizó una inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-Proteína fluorescente roja (RFP). Este anticuerpo está diseñado para reconocer y unirse a epítomos específicos y conservados presentes en proteínas fluorescentes rojas derivadas de DsRed como mCherry y tdtomato. Tanto tdtomato como mCherry pueden emitir fluorescencia por sí mismas. Tdtomato con una longitud de onda máxima de excitación de 554 nm y de emisión de 581 nm; mientras que mCherry con una longitud de onda máxima de excitación de 587 nm y de emisión de 610 nm. RFP por su parte tiene su excitación máxima a 558 nm, y de emisión a 583 nm (Piatkevich & Verkhusha, 2011). El hecho de utilizar RFP permite la amplificación de la señal y la proporción de una señal más consistente y menos dependiente de las condiciones de fijación, ya que el procedimiento puede disminuir la fluorescencia intrínseca de las proteínas (Tang et al., 2021). La transducción fue exitosa logrando la expresión ectópica de ambas, aunque la infección fue baja, del 31% y del 50% respectivamente (**Figura 12**).

Con respecto a las diferencias en la eficiencia de infección entre TdTomato y ChR2-mCherry, el constructo ChR2-mCherry es más grande debido a la inclusión de la secuencia de la ChR2 además de la proteína fluorescente mCherry. Un constructo más grande puede acercarse o exceder la capacidad de los AVV de 4.8 kb, lo que afecta negativamente la eficiencia de empaquetamiento y transducción del virus, resultando en una menor tasa de

infección (Hermonat et al., 1997; Hirsch et al., 2016). En segundo lugar, la expresión de ChR2, una proteína de membrana es más complicada y potencialmente estresante para las células en comparación con la expresión de TdTomato, una proteína fluorescente citosólica. La inserción y correcto plegamiento de proteínas de membrana como ChR2 pueden afectar la viabilidad celular y reducir la eficiencia de expresión, contribuyendo así a una menor tasa de infección efectiva (Yang, 2015).

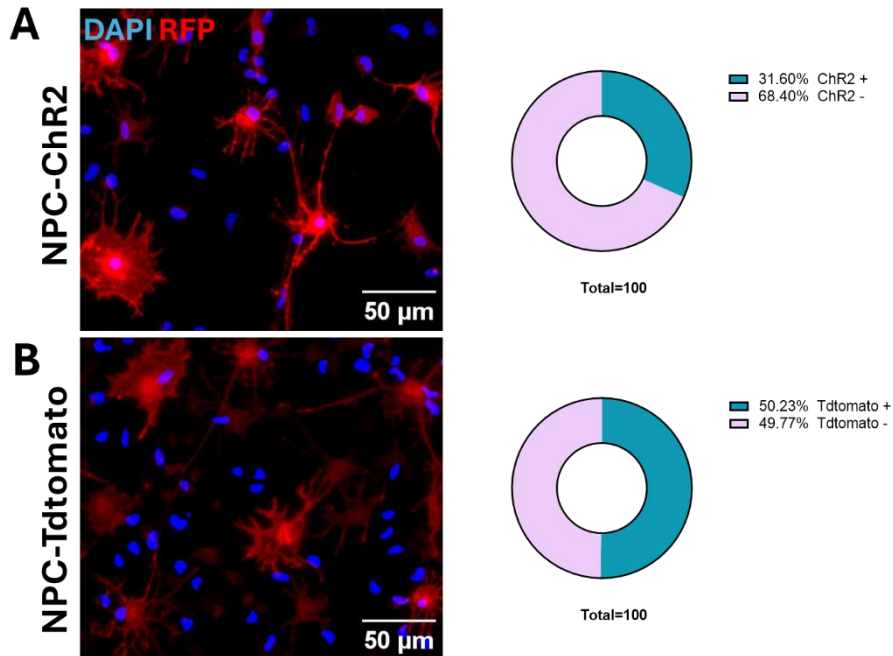


Figura 12. Eficiencia de transducción de ChR2 y Tdtomato en NPCs. (A) Porcentaje de NPCs expresando ChR2-mCherry. (B) Porcentaje de NPCs expresando Tdtomato-mCherry.

Por otra parte, en cuanto a la baja eficiencia de ambas, Los vectores AAV9 tienen una eficiencia de transducción relativamente baja en varios tipos de células madre y progenitoras, incluyendo las NPCs. Esto se debe en gran medida a la baja presencia de receptores celulares adecuados para el serotipo AAV9 en la superficie de estas células no diferenciadas. Ejemplos incluyen los proteoglicanos de sulfato de heparán y los glicanos sialilados (Shen et al., 2011). Los receptores específicos descritos incluyen el receptor de laminina (LamR) y la galactosa terminal en glicoproteínas de la superficie celular. Sin embargo, la baja abundancia de estos receptores en cultivos celulares in vitro puede explicar la menor eficiencia de transducción observada en tus experimentos (Ambrosi et al. 2019; Shen et al., 2011). Al mismo tiempo, la baja abundancia de glicanos no sialilados con galactosa terminal en la superficie de células cultivadas in vitro reduce la afinidad de AAV9 para la transducción. La desialilación enzimática de células cultivadas ha demostrado aumentar la eficiencia de transducción, presumiblemente al exponer los residuos de galactosa que actúan como receptores de AAV9 (Shen et al., 2011).

A pesar de estos desafíos, el uso de AAV serotipo 9 para transducir células precursoras neurales presenta varias ventajas. AAV9 se ha destacado por su capacidad para transducir de manera eficiente el SNC debido a su alto tropismo por este tejido. Además, los vectores AAV9 son predominantemente episomales e integran en el genoma del huésped a frecuencias relativamente bajas, lo que reduce el riesgo de mutagénesis por inserción en comparación con los vectores virales integrativos como los lentivirus. Esto hace que AAV9 sea una opción segura para aplicaciones clínicas, ya que su baja inmunogenicidad y falta de patogenicidad contribuyen a su perfil de seguridad. Además, se ha descrito que permiten la expresión a largo plazo del constructo genético entregado, lo cual es

beneficioso para terapias que requieren una expresión sostenida del gen de interés (Gil-Farina y Schmidt, 2016 ; Hordeaux et al., 2019; Bravo-Hernández et al., 2020).

Para mejorar la eficiencia de infección y lograr una tasa de transducción más equitativa entre los constructos que expresan ChR2-mCherry y tdTomato, se podrían considerar varias estrategias científicas. Entre ellas, el diseño de constructos virales más pequeños optimizando y reduciendo el tamaño del constructo que expresa ChR2-mCherry, podría mejorar la eficiencia de empaquetamiento del AAV9 y, por ende, su capacidad de transducción. Además, el desarrollo y la utilización de AAV recombinantes con mayores eficiencias de transducción en NPCs podrían proporcionar mejoras significativas en la eficiencia global (Jang et al., 2011). Asimismo, se podrían aplicar métodos como la desialilación enzimática de las NPCs para incrementar la disponibilidad de receptores específicos de AAV9 en la superficie celular, aumentando así la afinidad viral y la tasa de internalización.

4.1.2 La estimulación optogenética permite la activación de NPC-ChR2 y genera activación paracrina en NPCs sin transducir.

Para evaluar la activación neuronal, se puede analizar la entrada de Ca^{2+} celular o monitorear la transcripción y traducción de genes tempranos inmediatos, como c-Fos (Hudson, 2018). Debido a que su expresión es rápida y transitoria, utilizamos dicho marcador para evaluar la efectividad del dispositivo optogenético LED de luz azul (470 nm) en la activación de las NPC-ChR2.

En células no diferenciadas como las NPC, la expresión de c-Fos en respuesta a la estimulación se observa principalmente en el núcleo, donde actúa como un factor de transcripción (Kovács, 1998). Por lo tanto, se evaluó su presencia nuclear tanto en los controles sin estimulación como después de la primera, segunda y tercera estimulación diaria en células NPC-ChR2 o NPC-tdTomato. Si bien en ambos controles sin luz LED azul los porcentajes de c-Fos fueron más bajos que después de las estimulaciones, únicamente se observaron diferencias significativas de un 30% después de la segunda estimulación en NPC-ChR2 en comparación con su control sin estimular, pero no en comparación con su control tdtomato. Sin embargo, es importante recordar que en el cultivo celular no solo hay NPCs que expresan ChR2 de manera ectópica, sino también un gran porcentaje sin transducir. De ese 30% de activación, el 34% provenía de las transducidas y el 66% de aquellas que no expresaban ChR2, lo que sugiere posible efecto paracrino (**Figura 13**).

Al evaluar el porcentaje de c-Fos en el total de las células que expresaban ectópicamente tdTomato o ChR2, se observó un aumento después de la primera y segunda estimulación de NPC-ChR2. Sin embargo, solo la segunda estimulación se diferencia significativamente de su control TdTomato, indicando que una sola estimulación diaria no es suficiente. Por otra parte, la tercera estimulación diaria parece disminuir la expresión de c-Fos, lo que indica una posible saturación (**Ver anexo 1**).

Por lo tanto, estos resultados indican: **(1)** que el mecanismo de estimulación con LED es funcional ya que activa el canal iónico, **(2)** que se requieren dos estimulaciones diarias para lograrlo con los parámetros establecidos, **(3)** que podría haber una activación paracrina de NPCs que no expresan la ChR2.

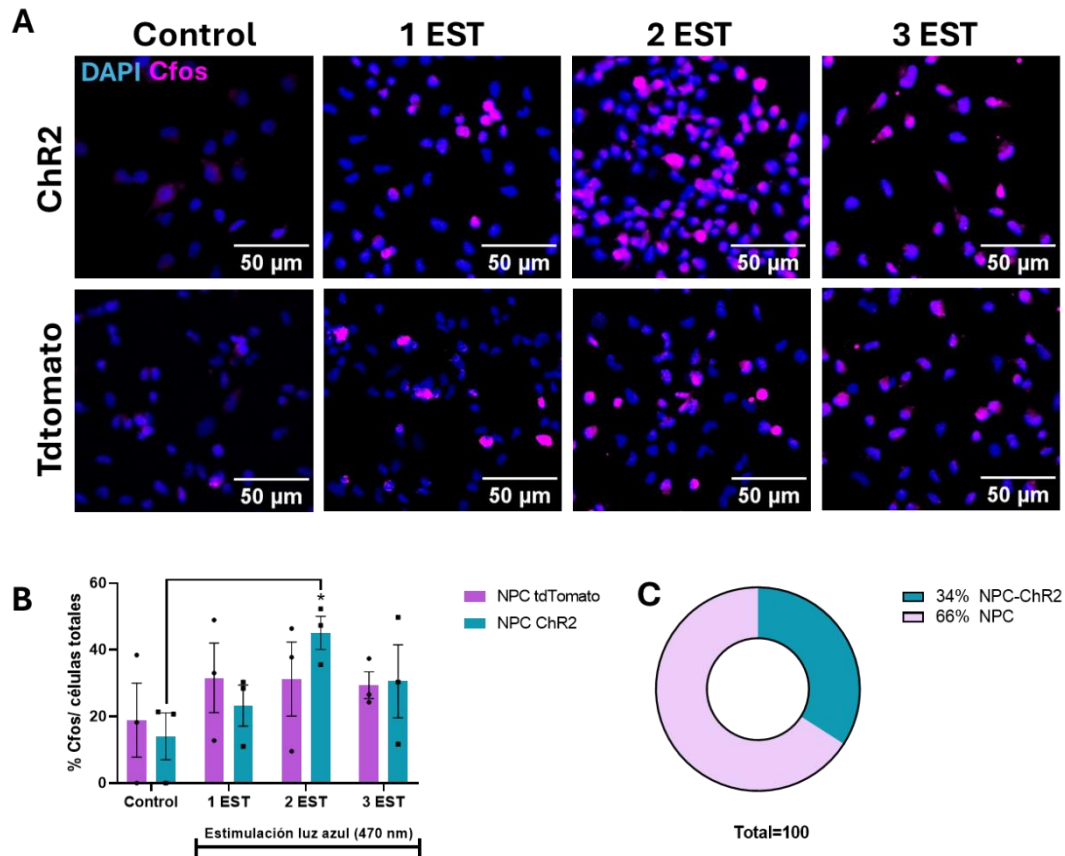


Figura 13. Activación de la ChR2 mediante estimulación optogenética con LED. (A) Microscopía de fluorescencia de NPC-ChR2 O Tdtomato marcadas con c-Fos. (B) Cuantificación del porcentaje de c-Fos sobre el total celular y (C) porcentaje de activación de c-Fos proveniente de NPC-ChR2 o de NPC sin transducir. Condiciones: células control, 1, 2 o 3 estimulaciones de BL LED o bien transducidas con ChR2 o con Tdtomato. Los datos representan la media \pm SEM. Para B: **p*-value < 0.05 comparado con control sin estimular. (ANOVA; *n* = 3; se tomaron 5 imágenes de cada experimento). EST: estimulación.

La activación de las NPCs en condiciones normales depende del ingreso de Ca^{2+} mediante el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR) y de canales de calcio dependientes del voltaje (VDCC), como los canales tipo L (Erickson et al., 2006). Al activar el mecanismo optogenético, este influjo de Ca^{2+} depende de la activación de la ChR. En ambos casos, se activan las vías CAM quinasa (CAMK) y MAP quinasa (MAPK) que inducen la fosforilación del factor de transcripción elemento de unión con respuesta cAMP (CREB) y gen tipo1 ETS (Elk-1), induciendo la transcripción de c-Fos (Seternes et al., 1998; Lara Aparicio et al., 2022, Deisseroth et al., 2003). La síntesis de c-Fos sigue a la acumulación de su ARNm y puede detectarse mediante inmunohistoquímica entre 20 y 90 minutos después de la estimulación, aunque se ha observado su presencia en el núcleo hasta 24 horas después, con una vida media de aproximadamente 2-5 horas (Rahmsdorf et al., 1987; Morgan & Curran, 1998).

Estudios previos sugieren que la expresión de c-Fos puede ser sumatoria y que la exposición repetida a estímulos podría llevar a una acumulación de la proteína hasta alcanzar un umbral observable (Herdegen et al., 1997). En nuestros resultados, la fijación de las células ocurrió 10 minutos después de cada estimulación, lo que podría significar

que los niveles de c-Fos observados estén reflejando una parte de la expresión de dicha estimulación, y otra parte de la acumulación de la estimulación previa. Esto podría explicar por qué una sola estimulación no mostró un aumento significativo en c-Fos, mientras que la segunda estimulación sí lo hizo. Además, la tercera estimulación podría estar induciendo un periodo refractario, donde la capacidad de respuesta de las células se ve disminuida, lo que explicaría la reducción en la expresión de c-Fos observada. Por lo tanto, para futuros experimentos podría ser más útil medir la entrada de Ca^{2+} para evaluar la activación celular.

Además, la función de c-Fos no se limita al núcleo. En el contexto de la diferenciación celular, se ha observado que una vez que las células han sido preparadas para diferenciarse, c-Fos se requiere en el citoplasma, asociado al retículo endoplásmico (RE), donde activa la síntesis de fosfolípidos (Rodríguez-Berdini et al., 2020). Este proceso es esencial para la expansión de la membrana celular necesaria para la diferenciación continua. Teniendo en cuenta que nuestras células NPCs no están diferenciadas, futuros experimentos podrían estudiar la localización de c-Fos en el citoplasma en los días posteriores a la estimulación optogenética para investigar si esta influencia en la diferenciación celular está ocurriendo.

4.2 Efecto de la estimulación optogenética *in vitro* sobre la diferenciación de NPC-ChR2

Para evaluar el efecto de la estimulación optogenética sobre la diferenciación de NPC-ChR2, se diseñó un experimento de diferenciación y se evaluó **(i)** su viabilidad al final del experimento, **(ii)** los tipos celulares presentes, **(iii)** la morfología, y **(iv)** la expresión de factores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios.

4.2.1 La estimulación optogenética diaria no afecta la viabilidad de las NPC-ChR2

En primer lugar, para evaluar el efecto de la estimulación con luz led de manera diaria sobre las NPC-ChR2, evaluamos el porcentaje de células NPC-ChR2 positivas sobre el número de células totales tanto en estimuladas como sin estimular. El porcentaje de NPC-ChR2 fue el mismo sobre el total del cultivo en ambas, lo que indica que la estimulación con luz LED no afecta dicha proporción (**Figura 14**). El porcentaje de infección fue de un 25% en torno al total celular y ni la infección ni la estimulación afecta la viabilidad celular.

Esto se corresponde con investigaciones previas donde la estimulación optogenética a 470nm no tiene ningún efecto en la viabilidad celular de NPC-ChR2 (Wang et al., 2014). Sin embargo, el hecho de que sobreviva la misma cantidad de NPC-ChR2 en ambos tratamientos no quiere decir que el mecanismo optogenético aumente la supervivencia a largo plazo. Estudios han demostrado que, a mayor concentración de Ca^{2+} en el medio, mayor supervivencia celular (Milosevic et al., 2006).

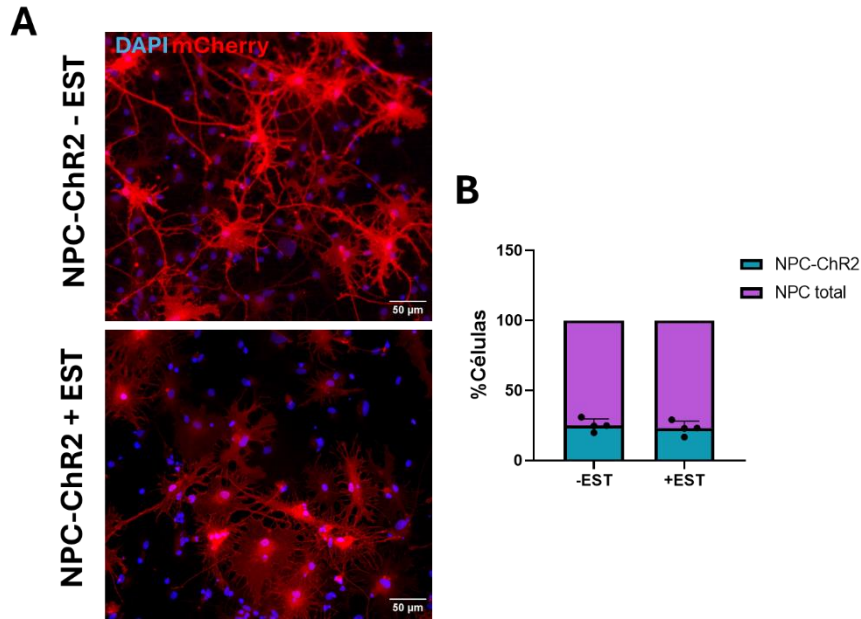


Figura 14. Efecto de la estimulación optogenética sobre la viabilidad de NPC-ChR2. (A) Microscopía de fluorescencia de NPC-ChR2 marcadas con RFP y DAPI (B) Cuantificación del porcentaje de ChR2 sobre el total celular. Condiciones: células control sin estimular (NPC-ChR2-EST) y estimuladas (NPC-ChR2 + EST). Los datos representan la media \pm SEM. No se han observado diferencias significativas. (T-test; n = 4; se tomaron 5 imágenes de cada experimento). EST: estimulación

4.2.2 La estimulación optogenética *in vitro* no favorece la diferenciación de las NPCs a ningún tipo celular en particular

Para evaluar el efecto de la estimulación optogenética sobre la diferenciación de las NPCs-ChR2, se realizaron inmunotinciones de marcadores específicos de determinados tipos celulares. Se cuantificaron el marcador de oligodendrocitos Olig2, el marcador neuronal β III-tubulina, y GFAP como marcador de astrocitos. En el caso de Olig2, si bien se observa en las ChR2 estimuladas un porcentaje levemente menor de células positivas para este marcador, los resultados no son significativos (**Figura 15**).

Nuestros resultados se contradicen con varios autores que aseguran que la activación por estimulación de las NPCs induce un incremento de la diferenciación de oligodendrocitos (Ono et al., 2017; Giraldo et al., 2020; Cuenca-Ortolá et al., 2022).

Idealmente, el incremento de oligodendrocitos en el entorno de una LM sería altamente beneficioso debido a su papel esencial en la remielinización, un proceso crucial para la recuperación funcional tras una LM, ya que promueve la regeneración axonal y la restauración de la comunicación neuronal en fases crónicas (Almad et al., 2011; Mekhail

et al., 2012). En línea con esto, actualmente existen tratamientos dirigidos a aumentar los oligodendrocitos como el uso de OPCs que han mostrado un potencial terapéutico significativo. Estos tratamientos se basan en la capacidad de las OPCs para diferenciarse en oligodendrocitos maduros. Además, estudios recientes han demostrado que su trasplante en modelos de LM puede mejorar la recuperación funcional mediante la promoción de la regeneración axonal y la reparación de la mielina dañada (Mekhail et al., 2012; Li & Leung, 2015). La influencia de la estimulación optogenética en la diferenciación de NPC y el equilibrio entre los efectos beneficiosos y adversos de los oligodendrocitos en el entorno de la LM son áreas cruciales para futuras investigaciones.

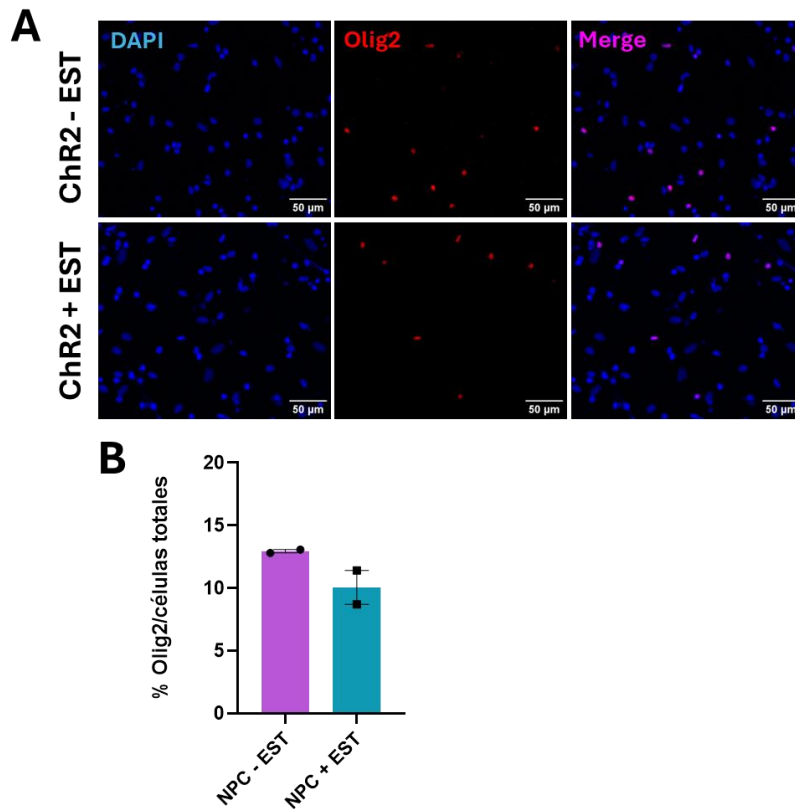


Figura 15. Efecto de la estimulación optogenética sobre la diferenciación de oligodendrocitos. (A) Microscopía de fluorescencia para el marcador Olig2 de NPC-ChR2 diferenciadas (B) Cuantificación del porcentaje de olig2 sobre el total celular. Condiciones: células control (ChR2-EST) y células estimuladas (NPC-ChR2 +EST). Los datos representan la media \pm SEM. No se observaron diferencias significativas (T-test; $n = 2$; se tomaron 5 imágenes de cada experimento). EST: estimulación

En cuanto al efecto de la estimulación optogenética hacia neuronas, se observa un \sim 5% de incremento de células β -tubulinIII positivas tras la estimulación, lo que se corresponde con un 40% respecto del control sin estimular (**Figura 16**).

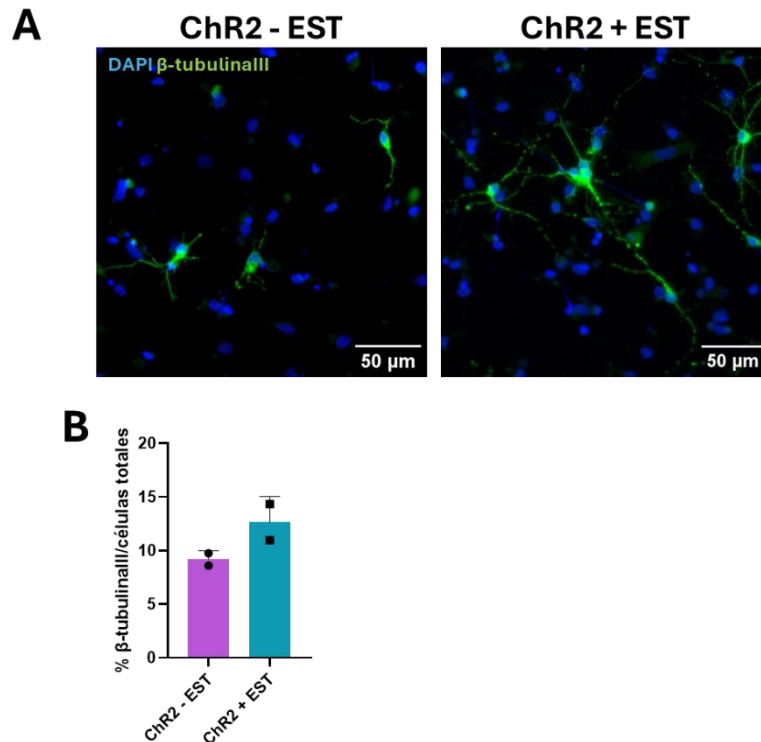


Figura 16. Efecto de la estimulación optogenética sobre la diferenciación neuronal. (A) Microscopía de fluorescencia para el marcador β -tubulin III en NPC-ChR2 diferenciadas (B) Cuantificación del porcentaje de β -tubulin III sobre el total celular. Condiciones: células control (Chr2-EST) y células estimuladas (NPC-ChR2 +EST). Los datos representan la media \pm SEM. No se observaron diferencias significativas (T-test; $n = 2$; se tomaron 5 imágenes de cada experimento). EST: estimulación

Más allá de que el incremento no sea significativo, este aumento se corresponde con la bibliografía donde se observa un impacto de la estimulación tanto optogenética como eléctrica en NPCs en la diferenciación neuronal *in vivo* e *in vitro* (Stroh et al., 2011; Cuenca-Ortolá et al., 2022; Giraldo et al., 2020; Kobelt et al., 2014). Esto destaca el papel crucial del Ca^{2+} como mediador en la diferenciación y maduración neuronal.

Este fenómeno de activación por estimulación está mediado por la entrada de Ca^{2+} a través de VDCCs y receptores NMDAR, lo que provoca la activación rápida de genes pro-neuronales como HES1, Id2 y NeuroD (Deisseroth et al., 2004). Adicionalmente, los niveles elevados de cAMP promueven la diferenciación neuronal de NPCs, probablemente a través de la regulación positiva de VDCCs mediada por cAMP (Lepski et al., 2013).

En el contexto de la estimulación optogenética, la despolarización mediada por Chr2 de NPCs en diferenciación podría activar VDCCs, lo que aumenta las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} . Dicho aumento, podría estimular la producción de cAMP, lo que a su vez regula positivamente más VDCCs, incrementando la excitabilidad y la activación de factores pro-neuronales, resultando en una mayor diferenciación de NPCs en neuronas. Además, la activación de c-Fos en NPC-ChR2 observada en los resultados anteriores podría ser esencial en la diferenciación continua, formación de nuevas neuronas y su crecimiento axónico, debido a su rol primario como factor de transcripción de genes de diferenciación, y secundario en la síntesis de fosfolípidos necesarios para este proceso (Rodríguez-Berdini et al., 2020).

Sin embargo, uno de los desafíos en los trasplantes de NPCs es que, a pesar de su multipotencia, el microambiente de la lesión tiende a promover su diferenciación en astrocitos, limitando su diferenciación en neuronas (Barnabé-Heider et al., 2010; Lu et al.,

2014; Panayiotou & Malas, 2013). Este incremento de tipos celulares neuronales observado en nuestros resultados tras el tratamiento optogenético podría tener importantes implicaciones para la recuperación funcional tras una LM y, podrían contribuir al crecimiento axónico y la reconexión del tracto corticoespinal, facilitando la recuperación de funciones motoras y sensoriales mediante la formación de nuevas sinapsis y el restablecimiento de circuitos neuronales dañados, lo cual es crucial en las fases crónicas de la lesión. Es por ello que, uno de los objetivos de las terapias es aumentar la población neuronal tras una LM, no solo mediante terapia celular para reemplazar las neuronas perdidas y promover la regeneración del tejido neural, sino también a través de la activación de la neurogénesis endógena, estimulando las propias NSCs para fomentar su diferenciación, o incluso el uso de terapia génica, todos demostrando un gran potencial (Yu et al., 2023; Zeng & Zhang, 2023; Gilbert et al., 2022).

Por último, la falta de significancia en el incremento β -tubulinaIII podría deberse a la variabilidad intrínseca en la respuesta de las NPCs a la estimulación optogenética o a la variabilidad inicial de los subtipos celulares presentes en el cultivo.

Refiriéndonos al marcador de astrocitos, GFAP, si bien no se observaron diferencias en células positivas tras la estimulación optogenética, se observó un porcentaje de casi el 100% en ambos tratamientos y esto se correlaciona con que actualmente no existen evidencias de que la estimulación optogenética podría favorecer la diferenciación hacia astrocito (**Figura 17**). Cabe aclarar, que en estos análisis algunas células fueron positivas para más de un marcador, donde la comparación ha sido únicamente entre NPC-ChR2 estimuladas y no estimuladas, y el 100% estaría representando la suma de las positivas para cada marcador. Esta observación de doble o triple positivo, sugiere que las células de nuestro experimento aún están en un estadio de diferenciación intermedio. Esto se corresponde con la diferenciación de las NPCs, que lejos de ser un proceso lineal y unidireccional, las células pueden encontrarse en estados transitorios en los que expresan múltiples marcadores de linajes celulares distintos (Dráberová et al., 2009; Miller-Rhodes, 2022).

Al principio del proceso de diferenciación, las células madre pluripotentes expresan genes de pluripotencialidad como SOX2, OCT4 y NANOG, que son cruciales para mantener su capacidad de auto-renovación y su potencial para diferenciarse en múltiples linajes. A medida que las células comienzan a comprometerse con el linaje neural, comienzan a expresar en paralelo otros marcadores específicos de progenitores neurales como Pax6, NeuroD1 y Nestina (Dráberová et al., 2009; Kovács, 2016). Estos marcadores son indicativos de que las células han entrado en un estadio de progenitor neural, preparando el camino para una diferenciación más específica. A medida que los progenitores neurales continúan su proceso de diferenciación, comienzan a expresar simultáneamente una combinación de marcadores más específicos como GFAP, Olig2 y β -tubulina III (Dráberová et al., 2009). Finalmente, una vez que las células progenitoras neurales están listas para diferenciarse completamente, la expresión de estos marcadores específicos se restringe a un solo linaje, completando así el proceso de diferenciación y dando lugar a astrocitos, neuronas u oligodendrocitos completamente diferenciados (Miller-Rhodes, 2022).

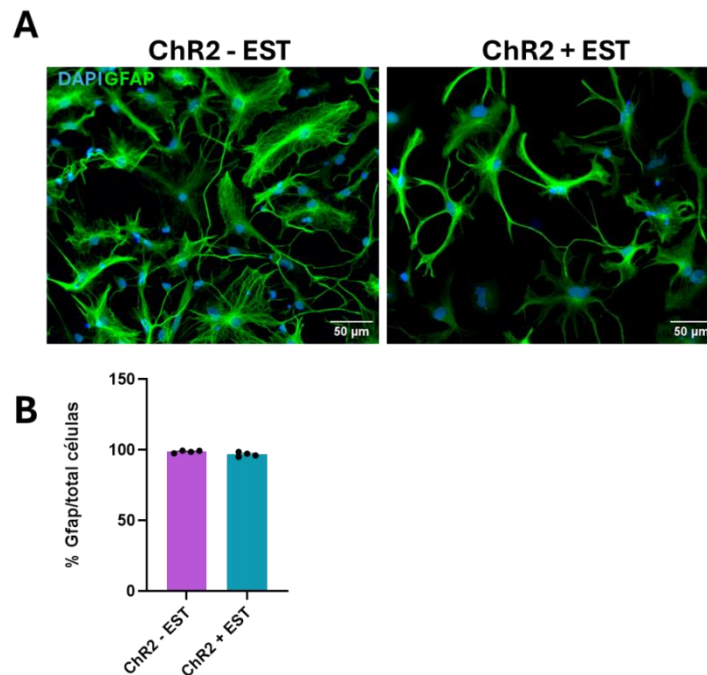


Figura 17. Efecto de la estimulación optogenética sobre la diferenciación astrocítica. (A) Microscopía de fluorescencia para el marcador GFAP en NPC-ChR2 diferenciadas (B) Cuantificación del porcentaje de GFAP sobre el total celular. Condiciones: células control (ChR2-EST) y células estimuladas (NPC-ChR2 +EST). Los datos representan la media \pm SEM. No se observaron diferencias significativas (T-test; $n = 4$; se tomaron 5 imágenes de cada experimento). EST: estimulación

Cabe aclarar, que se ha visto que los astrocitos pueden derivar de diferentes células de origen como por ejemplo a partir de Oligodendrocitos, lo cual indica una heterogeneidad no solo de marcadores sino en los estadios de diferenciación (Oberheim et al., 2024).

Este patrón de co-expresión refleja un estadio intermedio de diferenciación donde las células se mantienen heterogéneas, sin una identidad definitiva, y se encuentran en una fase de transición de plasticidad intrínseca en la que pueden diferenciarse hacia astrocitos, oligodendrocitos o neuronas (Galiakberova & Dashinimaev, 2020; Kovács, 2016). Durante este periodo, las células están altamente influenciadas por las señales del microambiente y las vías de señalización intracelular que regulan su destino celular. Esta fase intermedia es crucial para la neurogénesis y la gliogénesis, ya que permite una respuesta flexible y adaptativa a las señales internas y externas, y está regulada por una red compleja de factores de transcripción y modificadores epigenéticos. Por ejemplo, Rybp (Ring1 and YY1 binding protein), un regulador clave en la diferenciación neural, modula la expresión de genes específicos necesarios para la neurogénesis. Durante la diferenciación, Rybp y otros factores pueden influir en la expresión de múltiples marcadores, lo que resulta en células que muestran características de más de un linaje (Kovács, 2016).

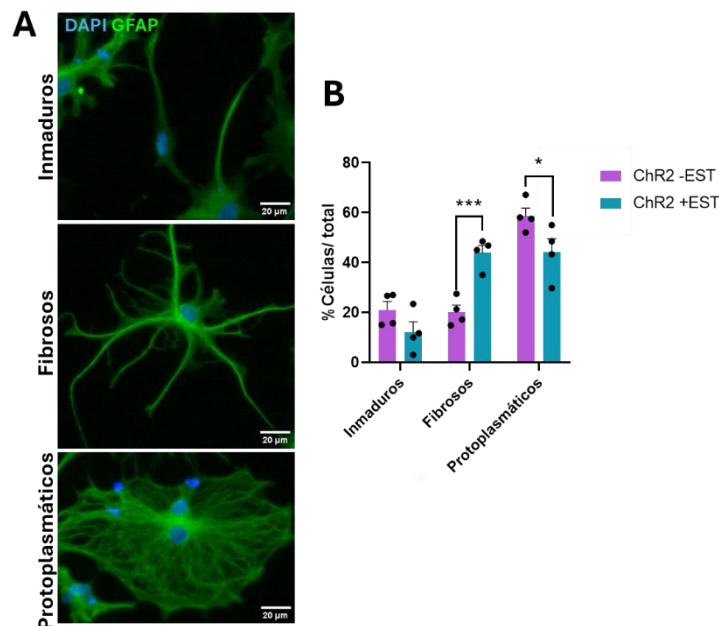
4.2.3 La estimulación optogenética de NPC-ChR2 favorece la maduración astrocítica a distintos subtipos morfológicos

Aunque no hay diferencias en el número de astrocitos tras la estimulación optogenética, previamente en el laboratorio se observaron cambios morfológicos que podría indicar que tras la estimulación se obtienen astrocitos con diferente fenotipo y grado de activación. Los astrocitos se dividieron en 3 tipos teniendo en cuenta su morfología: inmaduros, fibrosos, y protoplasmáticos, observándose que la estimulación resulta en un incremento de los fibrosos y en una disminución de las poligonales (**Figura 18**).

La clasificación establecida de los dos subtipos astrocíticos maduros se basa en diferencias en su morfología y ubicación anatómica, ya que los astrocitos protoplasmáticos se encuentran principalmente en la materia gris y los astrocitos fibrosos en la materia blanca. Son funcional y bioquímicamente distintos, con perfiles de expresión génica diferentes (Tabata, 2015). Los astrocitos protoplasmáticos tienen una morfología ovoide poseen procesos altamente ramificados y densamente empaquetados, los astrocitos fibrosos muestran procesos largos, rectos y menos densamente empaquetados. Por su parte, los astrocitos inmaduros poseen un cuerpo pequeño definido y 2 procesos largos a cada lado. En línea con esta clasificación, el subtipo fibroso está asociado con los A2, anti-inflamatorios, y el protoplasmático con el tipo A1, pro-inflamatorio, mientras que los inmaduros son astrocitos en proceso de diferenciación (Adewumi et al., 2024).

La diferenciación de los astrocitos en sus diferentes subtipos parece estar mediada por el microambiente de estas regiones. Algunas evidencias destacan que los mecanismos celulares y moleculares que gobiernan la diferenciación y maduración hacia un subtipo u otro son claramente distintos; sin embargo, cómo se regula específicamente esta maduración a nivel molecular aún no está claro, ya que estudios recientes se han centrado más en el papel funcional y fisiológico de estos subtipos (Miller & Raff, 1983; Oberheim et al., 2012). La excitabilidad y el incremento de Ca^{2+} puede afectar el fenotipo de los astrocitos, su función y la naturaleza o magnitud de la liberación de gliotransmisores. De hecho, estudios previos indicaron que los aumentos en los niveles intracelulares de cAMP podrían convertir los astrocitos protoplasmáticos en astrocitos fibrosos, pudiendo ser el posible mecanismo a través del cual la estimulación optogenética afecta la morfología astrocítica y posiblemente, su función inflamatoria (Adewumi et al., 2024).

Figura 18. Efecto de la estimulación optogenética sobre la morfología de astrocitos provenientes de



NPC-ChR2. (A) morfología de astrocitos fibroso, protoplasmático e inmaduro (B) Cuantificación del porcentaje de cada subtipo celular sobre el total celular. Subtipos de astrocitos: inmaduros, fibrosos, protoplasmáticos. Condiciones: Control sin estimular (ChR2 -EST) y células estimuladas (ChR2 +EST). Los datos representan la media \pm SEM. *p-value < 0.05 comparado con control sin estimular (ChR2 -EST); ***p-value < 0.001 comparado con control sin estimular (ChR2 -EST). (ANOVA; n = 4; se tomaron 5 imágenes de cada experimento). EST: estimulación.

Es difícil predecir las implicaciones funcionales del efecto observado de la estimulación optogenética en la maduración astrocítica en el contexto de la terapia celular para la LM.

Este tipo celular es clave en la formación de sinapsis, la modulación de la inflamación, la regulación del microambiente extracelular, el soporte metabólico a las neuronas, etc. Los numerosos procesos de los astrocitos protoplasmáticos penetran todas las áreas locales abarcando las sinapsis y la microvasculatura, regulando el flujo sanguíneo, manteniendo la barrera hematoencefálica, y modulando las sinapsis. Por su parte, los astrocitos fibrosos también están asociados con los vasos sanguíneos y proporcionan soporte a los axones que los contactan en los nodos de Ranvier. En este sentido, tener un mayor número de este tipo podría apoyar los axones en crecimiento en el sitio de la lesión. Sin embargo, la reducción de astrocitos protoplasmáticos podría tener consecuencias perjudiciales en las sinapsis ya que se ha descrito que secretan factores neuroregenerativos como BDNF (Oberheim et al., 2012).

Tras una lesión, tanto los astrocitos protoplasmáticos como los fibrosos se vuelven reactivos, aunque presentan morfologías hipertróficas y disposición espacial distintas (Aderson et al., 2013). Incluso si la proliferación de astrocitos fibrosos parece ser más prominente que en el caso de los astrocitos protoplasmáticos tras una lesión, la contribución particular de cada uno de ellos a los efectos beneficiosos y perjudiciales de la astrogliosis reactiva no se ha descifrado, principalmente debido a la alta complejidad y heterogeneidad de la respuesta astrocítica a la LM. Se cree que la señalización de Ca^{2+} y la proteína S100B dependiente de Ca^{2+} están involucrados en la inducción del estado reactivo en los astrocitos tras una lesión (Shigetomi et al., 2019). Sin embargo, en nuestros resultados el aumento de astrocitos fibrosos tras la estimulación optogenética podría indicar o bien que la entrada de Ca^{2+} en realidad este ejerciendo un rol anti-inflamatorio o bien que este efecto anti-inflamatorio proviene de otra vía independiente del Ca^{2+} . Debido a que existe gran variación en la dinámica de Ca^{2+} , esto podría ser porque la amplitud, duración y frecuencia de las señales de Ca^{2+} activadas por optogenética sean diferentes de las activadas en astrocitos reactivos, así como las vías de señalización intracelulares que estos activan (Shigetomi et al., 2019).

4.2.4 La estimulación optogenética permite la disminución de marcadores pro-inflamatorios e induce la expresión de marcadores anti-inflamatorios en astrocitos derivados de NPCs-ChR2 diferenciadas

Debido a que la morfología astrocítica y su reactividad es un cambio dinámico según las condiciones del microambiente, y a que las morfologías no aseguran al 100% un fenotipo inflamatorio o anti-inflamatorio, decidimos evaluar la reactividad mediante marcadores moleculares. Por lo tanto, evaluamos mediante inmunotinción los porcentajes de astrocitos positivos para el marcador inflamatorio NF- κ B, y para el marcador anti-inflamatorio arginasa.

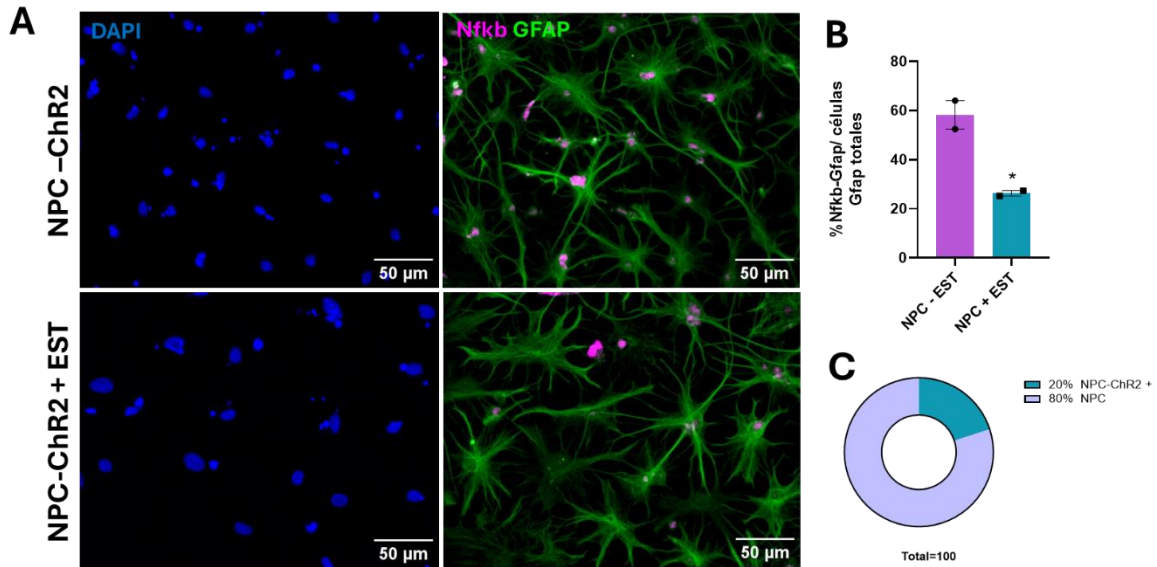


Figura 19. Efecto de la estimulación optogenética sobre el marcador de reactividad astrocítico NF-κB. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia para los marcadores GFAP y NF-κB en NPC-ChR2 diferenciadas (B) Cuantificación del porcentaje de células GFAP- NF-κB positivas sobre el total de células GFAP. Condiciones: células control (NPC-EST) y células estimuladas (NPC +EST). (C) Porcentaje de procedencia celular de la disminución de NF-κB total. Los datos representan la media \pm SEM. *p-value < 0.05 comparado con control sin estimular (NPC -EST); (T-test; n = 2; se tomaron 5 imágenes de cada experimento). EST: estimulación.

Tras la estimulación optogenética, se observó en astrocitos (células GFAP positivas), una disminución total de la expresión de NF-κB, alrededor del 50% con respecto a la expresión basal de esta proteína. Esta reducción de NF-κB no se debe exclusivamente a las células que expresaban ChR2. De hecho, las células GFAP-ChR2 positivas sólo contribuyen alrededor de un 20% a esa reducción, mientras que el resto de las células GFAP positivas pero que no expresaban ChR2, contribuyen en esa reducción de NF-κB un 80%. Este resultado nos indica que la estimulación optogenética no solo tiene un efecto directo sobre las NPCs que expresan la ChR2 sino que a través de la estimulación de éstas, pueden ejercer un efecto paracrino sobre el resto de las células (**Figura 19; Anexo 2**). En resumen, podemos decir que *con un ~25-30% de infección de ChR2, la estimulación optogenética disminuye a la mitad la expresión basal total de NF-κB en astrocitos, y que esta disminución está dada en un 20% por las NPC-ChR2, y el restante 80% por las NPCs no transducidas, indicando un efecto paracrino.*

Al evaluar los niveles de arginasa en el total de células GFAP positivas, se observó un incremento, aunque no significativo, de casi el doble de su expresión (85%) con respecto a la expresión basal de arginasa. Este incremento no se debe exclusivamente a las células GFAP que expresaban ChR2. De hecho, las células GFAP-ChR2 positivas sólo contribuyen alrededor de un 30% a esa reducción, mientras que el resto de las células GFAP positivas pero que no expresaban ChR2, contribuyen a ese incremento de arginasa un 70%. Este resultado nos indica que la estimulación ontogenética no solo tiene un efecto directo sobre las NPCs que expresan la ChR2 sino que a través de la estimulación de éstas, pueden ejercer un efecto paracrino sobre el resto de las células (**Figura 20; Anexo 3**). En resumen, podemos decir que *con un ~25-30% de infección de ChR2, la expresión de arginasa total incrementa a casi el doble con respecto a la expresión basal de esta proteína tras la estimulación optogenética, y que este incremento está dado en un 30% por las NPC-ChR2, y el restante 70% por las NPCs no transducidas, indicando un efecto paracrino.*

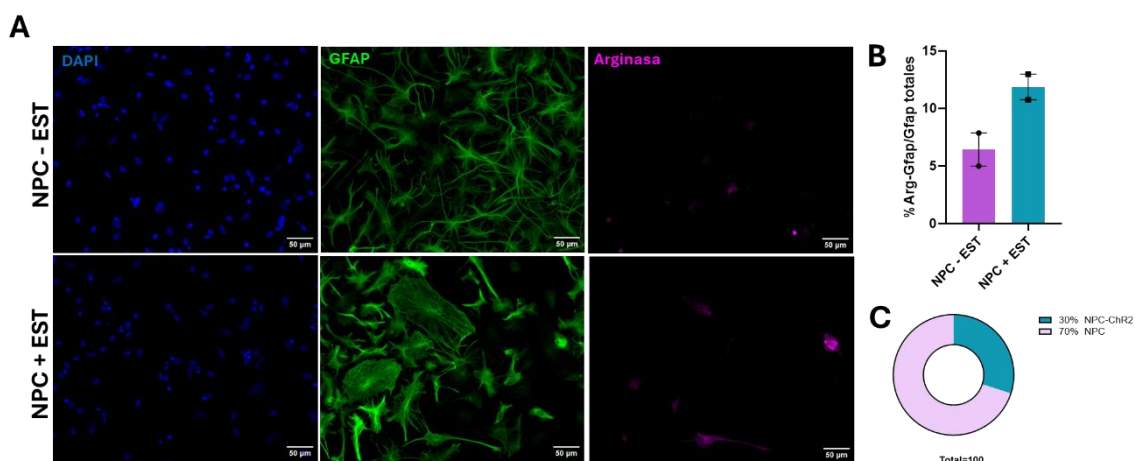


Figura 20. Efecto de la estimulación optogenética sobre el marcador de efectos anti-inflamatorios Arginasa. (A) Microscopía de fluorescencia para los marcadores GFAP y Arginasa en NPC-ChR2 diferenciadas (B) Cuantificación del porcentaje de células GFAP- Arginasa positivas sobre el total de células GFAP. Condiciones: células control (NPC-EST) y células estimuladas (NPC +EST). (C) Porcentaje de procedencia de la diferencia de Arginasa total. Los datos representan la media \pm SEM. No se han observado diferencias significativas; (T-test; n = 2; se tomaron 5 imágenes de cada experimento). EST: estimulación.

Estos resultados sugieren que la estimulación optogenética promueve un fenotipo de astrocito neuroprotector que ha demostrado previamente favorecer la supervivencia neuronal y la reparación de tejidos (Liddelow et al., 2017). La vía NF- κ B regula la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, TNF- α , IL-1 β y la supervivencia celular, y está fuertemente asociada con la neuroinflamación, así como con la reactividad neuroinflamatoria en astrocitos al inducir los subtipos A1. A su vez, la activación de NF- κ B en los astrocitos desempeña un papel crucial en la inflamación crónica y en la progresión de estas enfermedades (Liddelow & Barres, 2017). Como se ha comentado previamente, la diferenciación de las NPC-ChR2 dependerá de los factores presentes en el microambiente de la lesión que por lo general inducen la reactividad astrocítica, pero el hecho de que la estimulación optogenética esté fomentando a un microambiente anti-inflamatorio mediante la disminución de NF- κ B podría disminuir esos efectos in vivo (Yan et al. 2020).

La arginasa por su parte contribuye en la modulación de la neuroinflamación en las lesiones posiblemente a través de la reducción del óxido nítrico (ON) a través de la competencia con iNOS para el uso de L-arginina y por la activación de STAT-6 (Ahn et al., 2012). Estudios previos describieron que los astrocitos estimulados optogenéticamente protegían a las neuronas frente a la apoptosis y preservaban la integridad de la barrera hematoencefálica a través de la secreción de IL-10 (Suo et al., 2023). Debido a que la arginasa cumple roles inhibitorios de la apoptosis (Lange et al., 2004), la estimulación optogenética en astrocitos derivados de NPCs podría contribuir no solo la viabilidad celular de manera intrínseca, sino también extrínseca al proteger los demás tipos celulares del cultivo.

Además, nuestros resultados indican la presencia de un efecto paracrino por parte de las NPC-ChR2 hacia aquellos sin transducir la opsina. Esto podría ser debido a que la disminución de la reactividad de los astrocitos-ChR2, induzca la liberación de factores beneficiosos antiinflamatorios al medio como BDNF. También se ha observado en varios estudios que la fotoestimulación con LED de astrocitos que expresan ChR2 puede provocar un aumento del Ca²⁺ intracelular y respuestas electrofisiológicas no solo en las células estimuladas sino también en astrocitos y neuronas co-cultivadas que no expresan ChR2, donde el glutamato liberado por aquellos que expresan ChR2, podría mediar esta activación paracrina (Berlinguer Palmimi et al., 2014; Bang et al., 2016; Li et al., 2012).

4.3 Estudio del efecto paracrino de la estimulación optogenética de NPC-ChR2 sobre la reactividad de astrocitos maduros

Para evaluar la existencia del efecto paracrino de las NPC-ChR2 estimuladas sobre la reactividad de astrocitos maduros, se realizó un cocultivo de ambos tipos celulares. Para ello, se sembraron en placas de 6 multipocillos astrocitos adheridos al pocillo de la placa y se co-cultivaron con NPC-ChR2 sembradas en *inserts*. Además, se aplicó LPS para inducir una respuesta inflamatoria similar a la de la LM. LPS es un fuerte inductor de astrocitos A1, lo que incrementa la reactividad (Sofroniew & Vinters, 2010). Se realizaron 2 estimulaciones diarias durante 3 días y finalmente se evaluaron marcadores de reactividad astrocítica tanto proteicos mediante inmunofluorescencia como transcripcionales mediante qPCR.

4.3.1 La estimulación optogenética de NPC-ChR2 induce efectos paracrinos en astrocitos maduros en cocultivo

Para evaluar los efectos paracrinos de la estimulación optogenética de NPC-ChR2 sobre astrocitos maduros, se realizó un cocultivo de astrocitos maduros y NPCs-ChR2 (ver detalle del diseño experimental en la sección de materiales y métodos), y se midieron los niveles de expresión transcriptómica de los siguientes marcadores de reactividad astrocítica: SerpinA3n, Lcn2, Cxcl10, IL-6 e IL-1 β tanto en grupos control como en cocultivos (NPC-ChR2 + astrocitos) estimulados y sin estimular, y con o sin LPS. Se han analizado 6 grupos que consistieron en: **(i)** astrocitos control, **(ii)** astrocitos +LPS, **(iii)** cocultivo, **(iv)** cocultivo +EST, **(v)** cocultivo +LPS, **(vi)** cocultivo +LPS +EST. Luego, los valores se normalizaron y se muestran en las gráficas como el Fold Change +/- LPS de cada grupo: AST (astrocitos+LPS/astrocitos); Cocultivo +EST (cocultivo+LPS +EST/cocultivo +EST); cocultivo (cocultivo +LPS/ cocultivo); a excepción del Heatmap donde se comparan los niveles del cocultivo +LPS y el cocultivo +LPS +EST.

Se observa que tras la estimulación optogenética del cocultivo, los niveles de ARNm de Lcn2, SerpinA3, Cxcl10 e IL-6 disminuyen (Figura 23 A, B, C, D, F). Esto confirmaría la influencia paracrina de las NPC-ChR2 estimuladas optogenéticamente sobre los astrocitos maduros. Por otra parte, los niveles de reactividad de IL-1 β en el cocultivo tras la estimulación son más altos que sin estimular (Figura 21 E). Por ende, se puede resumir que con un ~25-30% de infección de ChR2, las NPC-ChR2 pueden inducir efectos paracrinos en los astrocitos maduros próximos, disminuyendo su reactividad.

La reactividad de los astrocitos depende del tipo de señalización inflamatoria que se active. La vía clásica relacionada con fenotipos de astrogliosis activa STAT3 que a su vez induce la vía NF κ B, mientras que la vía alternativa relacionada con la supervivencia celular y mecanismos anti-inflamatorios activa la vía STAT6. A su vez, la vía clásica se relaciona con genes pro-inflamatorios como SerpinA3n, LCN2, Cxcl10, IL-6 e IL-1 β y puede ser activada por LPS e IFN- γ , mientras que la activación de la vía alternativa depende de factores como Arg-1, IL-10, Fizz1, entre otros (Jang et al., 2013). Por otra parte, existe inhibición cruzada de ambas vías entre sí, por lo que los estímulos de activación clásicos o alternativos inducen cambios fenotípicos respectivos e inhiben fenotipos opuestos en los astrocitos (Bluthé et al., 2002).

SerpinA3n es un miembro de la superfamilia de inhibidores de serina proteasa (Serpín) (Zattoni et al., 2022). Promueve la neuroinflamación al activar la vía de señalización NFκB y promover la fosforilación de RYR2 (Liu et al., 2023). Aunque existen controversias acerca de su rol inflamatorio en algunos tipos celulares como neuronas y oligodendrocitos, es un marcador muy potente de astrogliosis (Zhu et al., 2024). LCN2 por su parte es conocido por ser un inductor de astrogliosis por activación de la vía inflamatoria clásica en astrocitos (IP et al., 2011). A su vez, bloquea la activación alternativa de los astrocitos al inhibir IL-4-STAT6 (Jang et al., 2013), y promueve cambios morfológicos y la migración celular de astrocitos de manera autocrina (Lee et al., 2009; Lee et al., 2011).

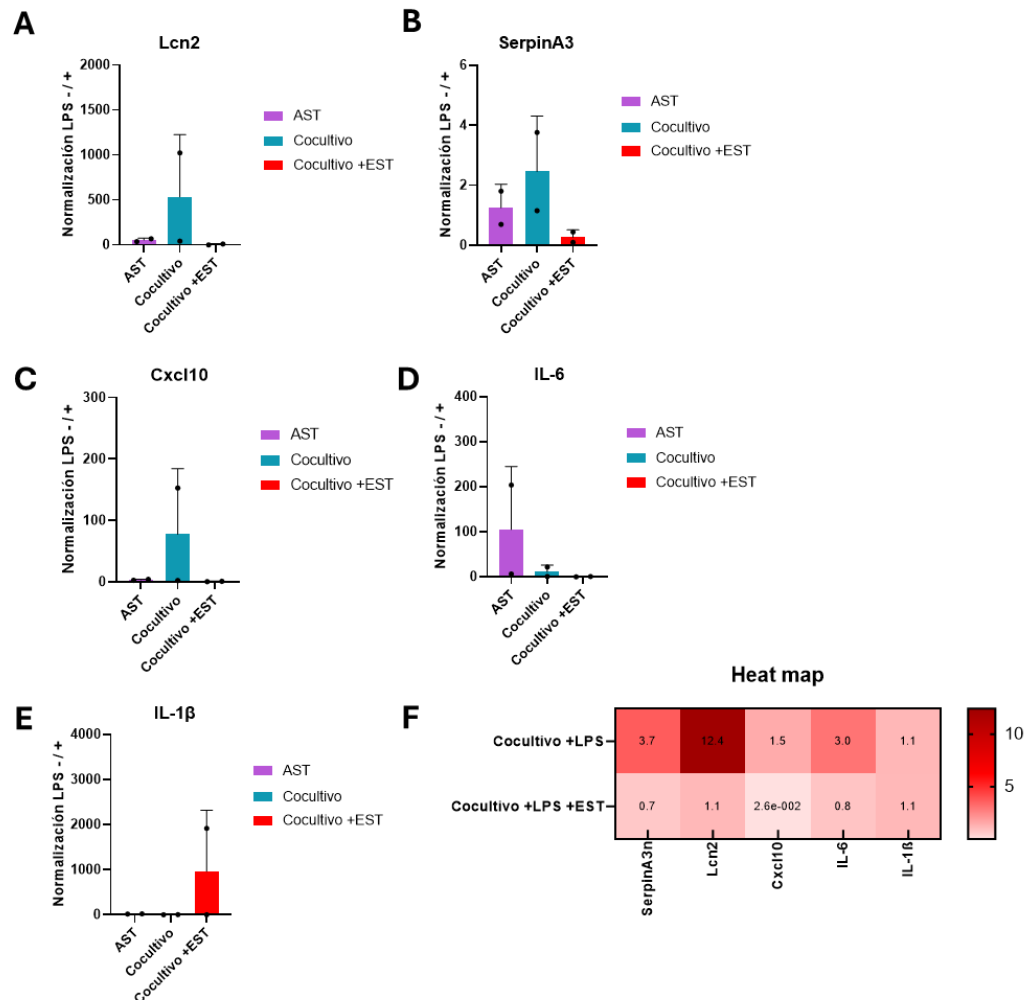


Figura 21. Efecto paracrino de la estimulación optogenética de NPC-ChR2 sobre los niveles de ARNm de marcadores de reactividad en astrocitos maduros. Fold-Change +/- LPS de los niveles de ARNm de (A) Lcn2 (B) SerpinA3; (C) Cxcl10; (D) IL-6 y (E) IL-1β. Condiciones: Control astrocito; Cocultivo estimulado; cocultivo. (F) Heat map de los niveles de ARNm de los marcadores pro-inflamatorios entre el grupo cocultivo +LPS vs cocultivo +LPS +EST. Los datos representan la media ± SEM. No se observaron diferencias significativas; (ANOVA; n = 2). EST: estimulación.

CXCL10 es un activador de la vía clásica. Se sabe que actúa como un potente quimioatrayente para células Th1, NK y macrófagos (Luster & Ravetch, 1987; Taub et al., 1993). Se induce localmente en el SNC en diversos estados patológicos. Específicamente en astrocitos, su expresión es bastante dinámica y puede regularse por una variedad de factores como IFN gamma, LPS, IL-1β, C1q por ejemplo (Oh et al., 1999; Liddelw et al., 2017). Además, CXCL10 producido por astrocitos regula no solo la acumulación de células inmunitarias sino también la desmielinización, la maduración de oligodendrocitos, y la

migración microglial hacia el sitio de la lesión, a través de un mecanismo mediado por CXCR3 (Liu et al., 2001; Nash et al., 2011).

IL-6 e IL-1 β son citoquinas pro-inflamatorias que actúan a través de la señalización de STAT3 activando la vía clásica. Se ha visto que su secreción induce la formación de astrocitos reactivos (Yin et al., 2006). Por su parte, la expresión de IL-6 aumenta significativamente en diversos trastornos del SNC y desempeña funciones pleiotrópicas durante los procesos (Acalovschi et al., 2003, Nakamura et al., 2005). La IL-6 secretada por astrocitos se une a receptores del complejo heterodimérico gp130/IL-6, activando la vía JAK/STAT que fosforila señales Stat3 y se expresan factores de transcripción (Wang et al., 2011; Vence et al., 2007). Esto desempeña diversos efectos biológicos, como la supervivencia celular, la apoptosis, la proliferación, la migración y la diferenciación neuronal y astrocítica (Gu et al., 2005, Kang y Kang, 2007, Schindler y Darnell, 1995, Ihle, 2001). IL-1 β por su parte, es un regulador temprano de astrogliosis (Herx & Yong, 2001). Los astrocitos de la médula espinal son la fuente principal de IL-1 β . A su vez, esta citoquina actúa en el receptor de interleucina-1 tipo 1 (IL-1R1) que es expresado en astrocitos y neuronas del asta dorsal de la columna en la fase crónica del dolor inflamatorio y que incluso induce muerte neuronal (Gajtkó et al., 2020). Altas concentraciones de IL-1 β estimulan la activación de NF- κ B y a su vez, la secreción de IL-6 está mediada por la vía de señalización NF- κ B (Gajtkó et al., 2020). Sin embargo, recientemente se descubrió que estas citoquinas no son del todo inductoras de reactividad. IL-1 β actuaría como potenciadora de los fenotipos pre-existentes. Es decir, que induce una regulación positiva de los genes marcadores A1 y A2 (Liddelw et al., 2017). En otro estudio, también se revelaron aspectos neuroprotectores de los astrocitos estimulados por IL-1 β , ya que los genes que codifican factores neurotróficos estaban regulados positivamente en los cultivos (Teh et al., 2017). En cuanto a IL-6, se ha observado que su efecto anti-inflamatorio o pro-inflamatorio depende del receptor y la señalización intrínseca que desencadene en cada tipo celular (Rothaug et al., 2016).

Habiendo corroborado cambios transcripcionales, decidimos evaluar el efecto paracrino de las NPC-ChR2 sobre astrocitos maduros en la expresión proteica del componente del complemento 3 (C3) como marcador de reactividad y el marcador anti-inflamatorio arginasa. Se evaluaron bajo los mismos tratamientos (Control; +LPS; +LPS +EST; +EST). Si bien sólo teníamos una réplica por lo que no se han podido realizar análisis estadísticos, se observa que con un 27% de infección de ChR2, la estimulación optogenética, a través de efectos paracrinos, incrementa en astrocitos maduros la expresión de arginasa al doble (100%) y disminuye la de C3 a la mitad (-50%) respecto de los niveles de expresión basales. Estos resultados se correlacionan con los de la inducción de un microambiente reactivo (+LPS). Tras la estimulación, esta reactividad es revertida incrementando los niveles de arginasa también al doble (100%) y disminuyendo la expresión de C3 un 75% con respecto a la expresión basal (**Figura 22**).

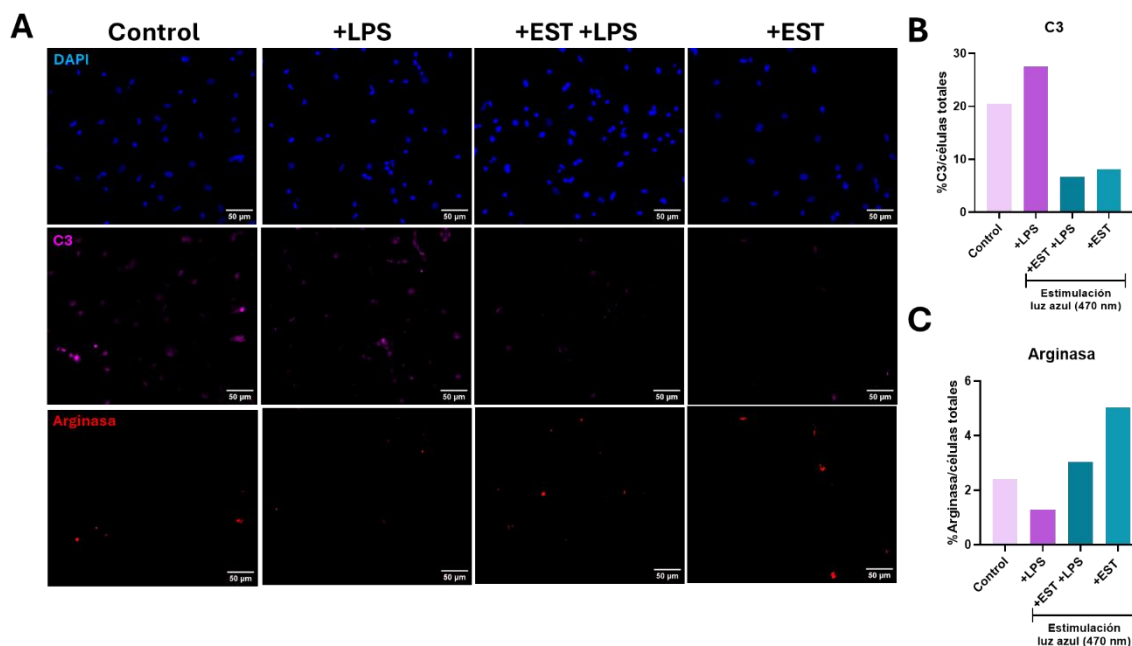


Figura 22. Efecto paracrino de la estimulación optogenética de NPC-ChR2 sobre la reactividad en astrocitos maduros mediante marcadores proteicos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios. (A) Microscopía de fluorescencia para los marcadores C3 y Arginasa en astrocitos maduros provenientes de cocultivo con NPC-ChR2. (B) Cuantificación del porcentaje de células C3 positivas sobre células totales. (C) Cuantificación del porcentaje de células Arginasa positivas sobre células totales. Condiciones: Control astrocitos (Control); Astrocitos +LPS (+LPS); Astrocitos +LPS estimulados (+EST +LPS) y astrocitos estimulados (+EST). Los datos representan la media \pm SEM. No se observaron diferencias significativas; (ANOVA; $n = 1$; se tomaron 5 imágenes de cada experimento). EST: estimulación.

Como se comentó previamente, la arginasa activa la vía alternativa de inflamación, muy relacionada con fenotipos de astrocitos que desempeñan un papel antiinflamatorio o neuroprotector (Jang et al., 2013). El incremento de este marcador tras la estimulación optogenética indica el efecto antiinflamatorio del tratamiento. Sin embargo, no se puede saber de qué manera interactúan las NPC-ChR2 con los astrocitos ni a través de factor paracrino surge este efecto. Por otra parte, se ha visto a C3 incrementado en astrocitos A1 pro-inflamatorios que secretan este tipo de componentes y quimiocinas que facilitan el reclute de células inmunes (Liddelow et al., 2017). A su vez, este componente es expresado como consecuencia de la activación de NF- κ B (Lawrence et al., 2022). Hace poco, se ha descubierto que estos astrocitos reactivos C3 positivos son distintos de aquellos activados por la vía clásica proinflamatoria, pero también exhiben funciones neurotóxicas (Taylor et al., 2022).

Estos resultados demostrarían la presencia de un efecto paracrino proteico de las NPC-ChR2 estimuladas con luz azul 470nm sobre la inducción de fenotipos astrocíticos anti-inflamatorios y la disminución de aquellos pro-inflamatorios.

4.4 Limitaciones y perspectivas futuras

A modo de discusión, hemos comprobado que la estimulación optogenética de NPC-ChR2 induce efectos intrínsecos y paracrinos beneficiosos en el contexto de la LM a distintos niveles: (i) tras 2 estimulaciones optogenéticas se activan no solo las NPC transducidas con ChR2 sino también las no transducidas, (ii) induce una diferenciación espontánea de NPC-ChR2 hacia fenotipos astrocíticos fibrosos anti-inflamatorios disminuyendo los niveles de NF- κ B y aumentando los de arginasa en aquellos transducidos como de aquellos no transducidos, donde los no transducidos aportan un porcentaje mayor a esa disminución de la inflamación, y por último, (iii) la estimulación optogenética de NPC-ChR2

también induce efectos anti-inflamatorios sobre astrocitos maduros. Para obtener estos resultados, se necesitó de un ~25-30% de infección de Chr2. Probablemente una infección más alta induzca mayores efectos.

Específicamente, la estimulación optogenética de NPC-Chr2 indujo la reducción proteica de C3 y marcadores transcriptómicos proinflamatorios como IL-6, LCN2, CXCL10 y SerpinA3n, que son activados por la vía STAT3 clásica de inflamación. Al mismo tiempo, observamos un incremento del marcador anti-inflamatorio arginasa, el cual es activado por vías alternativas mediadas por STAT6. Sin embargo, aún no se sabe si la estimulación optogenética actúa a través de estas vías o a través de otras. Estos hallazgos sugieren que la optogenética puede ser una herramienta poderosa para influir en la diferenciación y funcionalidad de las NPC, proporcionando un enfoque potencial para el tratamiento de lesiones de la ME y otras condiciones neuroinflamatorias modulando el ambiente celular y promoviendo un fenotipo neuroprotector.

Una limitación importante de este trabajo es que los resultados se basan en modelos de cultivo celular *in vitro*, que, aunque proporcionan información valiosa, pueden no replicar completamente las complejidades del microambiente de la LM *in vivo*. Además, no se han evaluado los efectos a largo plazo de la estimulación optogenética, por lo que sería crucial entender si los cambios observados se mantienen a lo largo del tiempo y si hay efectos adversos asociados con la estimulación prolongada en el injerto.

Otra limitación es la amplia variabilidad de los cultivos celulares, donde se necesitan varias N para poder obtener resultados congruentes. Esto ocurre específicamente en el diseño del experimento de cocultivo donde existen las variables del cultivo de NPC-Chr2 y de su transducción, de los astrocitos maduros, de la estimulación y de la adición de LPS, donde los tiempos de ambos cultivos son diferentes, y la puesta a punto de la cantidad de células a sembrar de cada tipo celular requiere de mucha precisión y sincronización entre ambos cultivos.

Para futuras investigaciones, se podrían evaluar los mecanismos paracrinos mediante los cuales las NPC-Chr2 estimuladas influyen en las células vecinas, incluyendo el estudio de factores solubles liberados y la posible comunicación intercelular a través de exosomas o VE. También es necesario profundizar si son STAT6 y STAT3, las vías de señalización involucradas en la modulación de la inflamación celular inducida por la optogenética. Finalmente, los estudios futuros deberían centrarse en evaluar la funcionalidad *in vivo* a largo plazo de las NPC-Chr2 diferenciadas y estimuladas incluyendo su capacidad para integrarse, funcionar adecuadamente en los circuitos neuronales existentes y modular las células endógenas, especialmente en el contexto de la reparación de la ME.

5 CONCLUSIONES

1. La estimulación optogenética lumínica mediada por la expresión de Chr2 en NPC es bien tolerada y no afecta la viabilidad.
2. En el tamaño de muestra -limitado- y el modelo *in vitro* empleado, la estimulación optogenética no promovió de forma significativa la diferenciación espontánea de los NPC modificados hacia ningún tipo celular concreto, sin embargo, existe tendencia positiva a la diferenciación neural.
3. La estimulación optogenética en NPC influye en la morfología y fenotipos astrocíticos, promoviendo aquellos fenotipos astrocíticos fibrosos menos reactivos y disminuyendo los fenotipos protoplasmáticos pro-inflamatorios.
4. La estimulación optogenética provoca una disminución en la mitad de la población celular de los niveles del marcador de reactividad NF- κ B nuclear en astrocitos

derivados de NPCs tanto ChR2 positivos como negativos, lo que sugiere efectos intrínsecos y paracrinos.

5. La estimulación optogenética aumenta los niveles de arginasa en astrocitos derivados de NPCs tanto en astrocitos ChR2 positivos como negativos, lo que sugiere un efecto tanto intrínseco como paracrino de carácter anti-inflamatorio.
6. Existe un efecto paracrino tras la estimulación optogenética de NPC-ChR2 sobre astrocitos maduros procedentes de médula espinal que se refleja en la disminución del ARNm de marcadores pro.inflamatorios (IL-6, LCN2, CXCL10, SerpinA3n) y la expresión del marcador proteico de astrogliosis C3, y en el incremento de la expresión del marcador anti-inflamatorio arginasa.

La optogenética podría ser una herramienta poderosa para influir en la diferenciación y funcionalidad de las NPC, ofreciendo un enfoque potencial para el tratamiento de lesiones de la ME y otras condiciones neuroinflamatorias. Sin embargo, es esencial realizar investigaciones adicionales para comprender completamente los mecanismos paracrinos y evaluar los efectos a largo plazo en modelos *in vivo* para validar el potencial terapéutico de la estimulación optogenética.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Acalovschi, D., Wiest, T., Hartmann, M., Farahmi, M., Mansmann, U., Auffarth, G. U., ... & Schwaninger, M. (2003). Multiple levels of regulation of the interleukin-6 system in stroke. *Stroke*, 34(8), 1864-1869.
- Adamantidis, A. R., Zhang, F., Aravanis, A. M., Deisseroth, K., & De Lecea, L. (2007). Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*, 450(7168), 420-424.
- Adewumi, H. O., Berniac, G. I., McCarthy, E. A., & O'Shea, T. M. (2024). Ischemic and hemorrhagic stroke lesion environments differentially alter the glia repair potential of neural progenitor cell and immature astrocyte grafts. *Experimental neurology*, 374, 114692. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2024.114692>
- Ahn, M., Yang, W., Kim, H., Jin, J. K., Moon, C., & Shin, T. (2012). Immunohistochemical study of arginase-1 in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain research*, 1453, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.03.023>
- Alim, I., Haskew-Layton, R. E., Aleyasin, H., Guo, H., & Ratan, R. R. (2014). Spatial, temporal, and quantitative manipulation of intracellular hydrogen peroxide in cultured cells. In *Methods in enzymology* (Vol. 547, pp. 251-273). Academic Press.
- Almad A, Sahinkaya FR, McTigue DM (2011) Oligodendrocyte fate after spinal cord injury. *Neurotherapeutics* 8: 262–273
- Almad, A., Sahinkaya, F. R., & McTigue, D. M. (2011). Oligodendrocyte fate after spinal cord injury. *Neurotherapeutics*, 8(2), 262-273.
- AMBROSI, C. M.; SADANANDA, G.; HAN, J. L. & ENTCHEVA, E. (2019). Adeno-Associated Virus Mediated Gene Delivery: Implications for Scalable in vitro and in vivo Cardiac Optogenetic Models. *Frontiers in Physiology*, 10, 168. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00168>
- Anderson, K. D. (2004). Targeting recovery: priorities of the spinal cord-injured population. *Journal of neurotrauma*, 21(10), 1371-1383.
- Anjum, A., Yazid, M. D. I., Fauzi Daud, M., Idris, J., Ng, A. M. H., Selvi Naicker, A., ... & Lokanathan, Y. (2020). Spinal cord injury: pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 21(20), 7533.
- Arboleda, D., Forostyak, S., Jendelova, P., Marekova, D., Amemori, T., Pivonkova, H., ... & Sykova, E. (2011). Transplantation of predifferentiated adipose-derived stromal cells for the treatment of spinal cord injury. *Cellular and molecular neurobiology*, 31, 1113-1122.
- Asher, R. A., Morgenstern, D. A., Shearer, M. C., Adcock, K. H., Pesheva, P., and Fawcett, J. W. (2002). Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells. *J Neurosci*. 22, 2225–2236. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-06-02225.2002
- Assinck, P., Duncan, G. J., Hilton, B. J., Plemel, J. R., & Tetzlaff, W. (2017). Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nature neuroscience*, 20(5), 637-647.
- Badhiwala JH, Wilson JR, Kwon BK, Casha S, Fehlings MG (2018) A review of clinical trials in spinal cord injury including biomarkers. *J Neurotrauma* 35: 1906–1917
- Badhiwala, J. H., Wilson, J. R., & Fehlings, M. G. (2019). Global burden of traumatic brain and spinal cord injury. *The Lancet Neurology*, 18(1), 24-25.
- Baptiste DC, Fehlings MG (2006) Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *J Neurotrauma* 23: 318–334
- Bartus K, James ND, Didangelos A, Bosch KD, Verhaagen J, Yanez-Munoz RJ, Rogers JH, Schneider BL, Muir EM, Bradbury EJ (2014) Large-scale chondroitin sulfate proteoglycan digestion with chondroitinase gene therapy leads to reduced pathology and modulates macrophage phenotype following spinal cord contusion injury. *J Neurosci* 34: 4822–4836
- Bathina, S., & Das, U. N. (2015). Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Archives of medical science: AMS*, 11(6), 1164–1178. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.56342>
- Bennett, J., Wellman, J., Marshall, K. A., McCague, S., Ashtari, M., DiStefano-Pappas, J., et al. (2016). Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: A follow-on phase 1 trial. *Lancet* 388, 661–672. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30371-3
- Bican, O., Minagar, A., & Pruitt, A. A. (2013). The spinal cord: a review of functional neuroanatomy. *Neurologic clinics*, 31(1), 1-18.
- Biernaskie, J., Sparling, J. S., Liu, J., Shannon, C. P., Plemel, J. R., Xie, Y., ... & Tetzlaff, W. (2007). Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 27(36), 9545-9559.

- Bluthé, R. M., Lestage, J., Rees, G., Bristow, A., & Dantzer, R. (2002). Dual effect of central injection of recombinant rat interleukin-4 on lipopolysaccharide-induced sickness behavior in rats. *Neuropsychopharmacology*, 26(1), 86-93.
- Bonner, J. F., Connors, T. M., Silverman, W. F., Kowalski, D. P., Lemay, M. A., & Fischer, I. (2011). Grafted neural progenitors integrate and restore synaptic connectivity across the injured spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 31(12), 4675-4686.
- Bonner, J. F., Haas, C. J., & Fischer, I. (2013). Preparation of neural stem cells and progenitors: neuronal production and grafting applications. *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols*, 65-88.
- Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., & Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature neuroscience*, 8(9), 1263-1268.
- Bravo-Hernandez, M., Tadokoro, T., Navarro, M. R., Platoshyn, O., Kobayashi, Y., Marsala, S., et al. (2020). Spinal subpial delivery of AAV9 enables widespread gene silencing and blocks motoneuron degeneration in ALS. *Nat. Med.* 26, 118–130. doi: 10.1038/s41591-019-0674-1
- Brown J. O., McCouch G. P. (1947). Abortive regeneration of the transected spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 87, 131–137. 10.1002/cne.900870204
- Burnside ER, De Winter F, Didangelos A, James ND, Andreica EC, Layard-Horsfall H, Muir EM, Verhaagen J, Bradbury EJ (2018) Immune-evasive gene switch enables regulated delivery of chondroitinase after spinal cord injury. *Brain*
- Chen G., Zhang Y. Q., Qadri Y. J., Serhan C. N., Ji R. R. (2018). Microglia in pain: detrimental and protective roles in pathogenesis and resolution of pain. *Neuron* 100, 1292–1311. 10.1016/j.neuron.2018.11.009
- Chen, W., Li, C., Liang, W., Li, Y., Zou, Z., Xie, Y., ... & Zhu, X. (2022). The roles of optogenetics and technology in neurobiology: a review. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 867863.
- Chen, W., Li, C., Liang, W., Li, Y., Zou, Z., Xie, Y., ... & Zhu, X. (2022). The roles of optogenetics and technology in neurobiology: a review. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 867863.
- Cho, T. A. (2015). Spinal Cord Functional Anatomy. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 21, 13–35. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000461082.25876.4a>
- Choi, D. B., Nam, G., Groh, D. M., Syed, S., Fridley, J. S., & Gokaslan, Z. L. (2019). Spinal Cord Anatomy. In *Spinal Cord Tumors* (pp. 43–53). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99438-3_3
- Clifford, T., Finkel, Z., Rodriguez, B., Joseph, A., & Cai, L. (2023). Current advancements in spinal cord injury research—glial scar formation and neural regeneration. *Cells*, 12(6), 853.
- Courtine, G., & Sofroniew, M. v. (2019). Spinal cord repair: advances in biology and technology. In *Nature Medicine*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0475-6>
- Cuenca-Ortolá, I., Martínez-Rojas, B., Moreno-Manzano, V., García Castelló, M., Monleón Pradas, M., Martínez-Ramos, C., & Más Estellés, J. (2022). A Strategy for Magnetic and Electric Stimulation to Enhance Proliferation and Differentiation of NPCs Seeded over PLA Electrospun Membranes. *Biomedicines*, 10(11), 2736.
- Curcio M, Bradke F (2018) Axon regeneration in the central nervous system: facing the challenges from the inside. *Annu Rev Cell Dev Biol* 34: 495–521
- Deisseroth, K. (2010). Controlling the brain with light. *Scientific American*, 303(5), 48-55.
- Deisseroth, K. (2011). Optogenetics. *Nature methods*, 8(1), 26-29.
- Deisseroth, K., Feng, G., Majewska, A. K., Miesenböck, G., Ting, A., & Schnitzer, M. J. (2006). Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *Journal of Neuroscience*, 26(41), 10380-10386.
- Deng, W. W., Wu, G. Y., Min, L. X., Feng, Z., Chen, H., Tan, M. L., ... & Hou, J. M. (2021). Optogenetic neuronal stimulation promotes functional recovery after spinal cord injury. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 640255.
- Deubner, J., Coulon, P., & Diester, I. (2019). Optogenetic approaches to study the mammalian brain. *Current opinion in structural biology*, 57, 157-163.
- Ditor DS, John SM, Roy J, Marx JC, Kittmer C, Weaver LC (2007) Effects of polyethylene glycol and magnesium sulfate administration on clinically relevant neurological outcomes after spinal cord injury in the rat. *J Neurosci Res* 85: 1458–1467
- Dráberová, E., Del Valle, L., Gordon, J., Marková, V., Šmejkalová, B., Bertrand, L., ... & Katsetos, C. D. (2008). Class III β -tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes: implications for phenotypic identity. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 67(4), 341-354.
- Erickson, E. S., Mooren, O. L., Moore, D., Krogmeier, J. R., & Dunn, R. C. (2006). The role of nuclear envelope calcium in modifying nuclear pore complex structure. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 84(3-4), 309-318.

- Escartin, C., Guillemaud, O., and Carrillo de Sauvage, M. (2019). Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia* 67, 2221–2247. doi: 10.1002/glia.23687
- Fawcett JW, Verhaagen J (2018) Intrinsic determinants of axon regeneration. *Dev Neurobiol* 78: 890–897
- Fehlings M. G., Tetreault L. A., Wilson J. R., Kwon B. K., Burns A. S., Martin A. R., et al.. (2017). A clinical practice guideline for the management of acute spinal cord injury: introduction, rationale, and scope. *Global Spine J.* 7, 84S–94S. 10.1177/2192568217703387
- Fehlings, Vaccaro, Boakye, Rossignol, Ditunno & Burns (2013). *Essentials of spinal cord injury: Basic research to clinical practice*. Thieme Medical Publishers, Inc. ISBN 978-1-60406-726-2 (alk. paper)—ISBN 978-1-60406-727-9 (eISBN)
- Fischer I., Dulin J.N., Lane M.A. Transplanting neural progenitor cells to restore connectivity after spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 2020;21:366–383. doi: 10.1038/s41583-020-0314-2.
- Fischer, I., Dulin, J. N., & Lane, M. A. (2020). Transplanting neural progenitor cells to restore connectivity after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(7), 366–383.
- Freund P, Schmidlin E, Wannier T, Bloch J, Mir A, Schwab ME, Rouiller EM (2009) Anti-Nogo-A antibody treatment promotes recovery of manual dexterity after unilateral cervical lesion in adult primates—re-examination and extension of behavioral data. *Eur J Neurosci* 29: 983–996
- Gajtkó, A., Bakk, E., Hegedús, K., Ducza, L., & Holló, K. (2020). IL-1 β Induced Cytokine Expression by Spinal Astrocytes Can Play a Role in the Maintenance of Chronic Inflammatory Pain. *Frontiers in physiology*, 11, 543331. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.543331>
- Galiakberova, A. A., & Dashinimaev, E. B. (2020). Neural stem cells and methods for their generation from induced pluripotent stem cells in vitro. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 815.
- Ganau, M., Zewude, R., & Fehlings, M. G. (2019). *Functional Anatomy of the Spinal Cord*. In *Degenerative Cervical Myelopathy and Radiculopathy* (pp. 3–12). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-97952-6_1
- Gilbert, Emily A. B., Nishanth Lakshman, Kylie S. K. Lau, and Cindi M. Morshead. (2022). "Regulating Endogenous Neural Stem Cell Activation to Promote Spinal Cord Injury Repair" *Cells* 11, no. 5: 846. <https://doi.org/10.3390/cells11050846>
- Gil-Farina, I., and Schmidt, M. (2016). Interaction of vectors and parental viruses with the host genome. *Curr. Opin. Virol.* 21, 35–40. doi: 10.1016/j.coviro.2016.07.004
- Giraldo, E., Palmero-Canton, D., Martinez-Rojas, B., Sanchez-Martin, M. D. M., & Moreno-Manzano, V. (2020). Optogenetic modulation of neural progenitor cells improves neuroregenerative potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 365.
- Gómez, R. M., Sánchez, M. Y., Portela-Lomba, M., Ghotme, K., Barreto, G. E., Sierra, J., & Moreno-Flores, M. T. (2018). Cell therapy for spinal cord injury with olfactory ensheathing glia cells (OECs). *Glia*, 66(7), 1267–1301.
- Gong, L., Lv, Y., Li, S., Feng, T., Zhou, Y., Sun, Y., & Mi, D. (2020). Changes in transcriptome profiling during the acute/subacute phases of contusional spinal cord injury in rats. *Annals of Translational Medicine*, 8(24).
- Goulão, M., & C Lepore, A. (2016). iPS cell transplantation for traumatic spinal cord injury. *Current stem cell research & therapy*, 11(4), 321–328.
- Griffin, J. M., & Bradke, F. (2020). Therapeutic repair for spinal cord injury: combinatory approaches to address a multifaceted problem. *EMBO molecular medicine*, 12(3), e11505.
- Grimpe B, Silver J (2004) A novel DNA enzyme reduces glycosaminoglycan chains in the glial scar and allows microtransplanted dorsal root ganglia axons to regenerate beyond lesions in the spinal cord. *J Neurosci* 24: 1393–1397
- Grosenick, L., Marshel, J. H., & Deisseroth, K. (2015). Closed-loop and activity-guided optogenetic control. *Neuron*, 86(1), 106–139.
- Gu, F., Hata, R., Ma, Y. J., Tanaka, J., Mitsuda, N., Kumon, Y., ... & Sakanaka, M. (2005). Suppression of Stat3 promotes neurogenesis in cultured neural stem cells. *Journal of neuroscience research*, 81(2), 163–171.
- Hara M., Kobayakawa K., Ohkawa Y., Kumamaru H., Yokota K., Saito T., et al.. (2017). Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nat. Med.* 23, 818–828. 10.1038/nm.4354
- Harrow-Mortelliti, M., Reddy, V., & Jimshelishvili, G. (2019). *Physiology, spinal cord*.
- Herrmann J. E., Imura T., Song B., Qi J., Ao Y., Nguyen T. K., et al.. (2008). STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 28, 7231–7243. 10.1523/JNEUROSCI.1709-08.2008
- Herx L. M., Yong V. W. (2001). Interleukin-1 beta is required for the early evolution of reactive astrogliosis following CNS lesion. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60 961–971. 10.1093/jnen/60.10.961

- Hilton BJ, Bradke F (2017) Can injured adult CNS axons regenerate by recapitulating development? *Development* 144: 3417–3429
- Hirsch, M. L., Wolf, S. J., & Samulski, R. J. (2016). Delivering transgenic DNA exceeding the carrying capacity of AAV vectors. *Gene Therapy for Neurological Disorders: Methods and Protocols*, 21-39.
- Hordeaux, J., Hinderer, C., Buza, E. L., Louboutin, J.-P., Jahan, T., Bell, P., et al. (2019). Safe and sustained expression of human iduronidase after intrathecal administration of adeno-associated virus serotype 9 in infant rhesus monkeys. *Hum. Gene Ther.* 30, 957–966. doi: 10.1089/hum.2019.012
- Houweling DA, van Asseldonk JT, Lankhorst AJ, Hamers FP, Martin D, Bar PR, Joosten EA (1998) Local application of collagen containing brain-derived neurotrophic factor decreases the loss of function after spinal cord injury in the adult rat. *Neurosci Lett* 251: 193–196
- <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00072> periodo refractorio C-fos
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506111000298>
- Hu, Y. F., Gourab, K., Wells, C., Clewes, O., Schmit, B. D., & Sieber-Blum, M. (2010). Epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC)—mediated recovery of sensory function in a mouse model of spinal cord injury. *Stem Cell Reviews and Reports*, 6, 186-198.
- Huang, L., Fu, C., Xiong, F., He, C., & Wei, Q. (2021). Stem cell therapy for spinal cord injury. *Cell transplantation*, 30, 0963689721989266.
- Huang, L., Fu, C., Xiong, F., He, C., & Wei, Q. (2021). Stem cell therapy for spinal cord injury. *Cell transplantation*, 30, 0963689721989266.
- Hudson A. E. (2018). Genetic Reporters of Neuronal Activity: c-Fos and G-CaMP6. *Methods in enzymology*, 603, 197–220. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.01.023>
- Hulsebosch, C. E. (2002). Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Advances in physiology education*, 26(4), 238-255.
- Hurtado A, Podinin H, Oudega M, Grimpe B (2008) Deoxyribozyme-mediated knockdown of xylosyltransferase-1 mRNA promotes axon growth in the adult rat spinal cord. *Brain* 131: 2596–2605
- IP, J., & Hofer, L. M. MULLER u. IL CAMPBELL (2011): Lipocalin 2 in the central nervous system host response to systemic lipopolysaccharide administration. *Journal of neuroinflammation*, 8, 124.
- Jakeman LB, Wei P, Guan Z, Stokes BT (1998) Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury. *Exp Neurol* 154: 170–184
- Jang, E., Kim, J. H., Lee, S., Kim, J. H., Seo, J. W., Jin, M., ... & Suk, K. (2013). Phenotypic polarization of activated astrocytes: the critical role of lipocalin-2 in the classical inflammatory activation of astrocytes. *The Journal of Immunology*, 191(10), 5204-5219.
- Joannides, A., Gaughwin, P., Schwiening, C., Majed, H., Sterling, J., Compston, A., & Chandran, S. (2004). Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells. *The Lancet*, 364(9429), 172-178.
- Jones, L. L., Margolis, R. U., and Tuszynski, M. H. (2003). The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 182, 399–411. doi: 10.1016/s0014-4886(03)00087-6
- Kalyani, A. J., Piper, D., Mujtaba, T., Lucero, M. T., & Rao, M. S. (1998). Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture. *Journal of Neuroscience*, 18(19), 7856-7868.
- Kang, M. K., & Kang, S. K. (2008). Interleukin-6 induces proliferation in adult spinal cord-derived neural progenitors via the JAK2/STAT3 pathway with EGF-induced MAPK phosphorylation. *Cell proliferation*, 41(3), 377-392.
- Kato, H. E., Zhang, F., Yizhar, O., Ramakrishnan, C., Nishizawa, T., Hirata, K., ... & Nureki, O. (2012). Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature*, 482(7385), 369-374.
- Keating, A. (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell stem cell*, 10(6), 709-716.
- Kelly, A., Ballerini, L., Lowery, M., & Biggs, M. (2017). 7.32 Engineering the neural interface.
- Kerstetter, A. E., & Miller, R. H. (2012). Isolation and culture of spinal cord astrocytes. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 814, 93–104. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_7
- KOBELT, L. J.; WILKINSON, A. E.; MCCORMICK, A. M.; WILLITS, R. K. & LEIPZIG, N. D. (2014). Short duration electrical stimulation to enhance neurite outgrowth and maturation of adult neural stem progenitor cells. *Annals of biomedical engineering*, 42(10), 2164–2176. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1058-9>
- Koda, M., Okada, S., Nakayama, T., Koshizuka, S., Kamada, T., Nishio, Y., ... & Yamazaki, M. (2005). Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. *Neuroreport*, 16(16), 1763-1767.
- Kopper, T. J., & Gensel, J. C. (2017). Myelin as an inflammatory mediator: Myelin interactions with complement, macrophages, and microglia in spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research*, 96(6), 969–977. doi:10.1002/jnr.24114
- Koshizuka, S., Okada, S., Okawa, A., Koda, M., Murasawa, M., Hashimoto, M., ... & Yamazaki, M. (2004). Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and

- promote functional recovery after spinal cord injury in mice. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 63(1), 64-72.
- Kovács, G. (2016). Rybp is required for neural differentiation of mouse embryonic stem cells (Doctoral dissertation, Szegedi Tudományegyetem (Hungary)).
 - Kovács, K. J. (1998). Invited review c-Fos as a transcription factor: a stressful (re) view from a functional map. *Neurochemistry international*, 33(4), 287-297.
 - Krassioukov, A., & Claydon, V. E. (2006). The clinical problems in cardiovascular control following spinal cord injury: an overview. *Progress in brain research*, 152, 223-229.
 - Lange, P. S., Langley, B., Lu, P., & Ratan, R. R. (2004). Novel roles for arginase in cell survival, regeneration, and translation in the central nervous system. *The Journal of nutrition*, 134(10), 2812S-2817S.
 - Tabatha, H. (2015). Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Frontiers in neuroscience*, 9, 114. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00114>
 - Lara Aparicio, S. Y., Laureani Fierro, Á. D. J., Aranda Abreu, G. E., Toledo Cárdenas, R., García Hernández, L. I., Coria Ávila, G. A., ... & Pérez Estudillo, C. A. (2022). Current opinion on the use of c-Fos in neuroscience. *NeuroSci*, 3(4), 687-702.
 - Laughlin, M. J., Barker, J., Bambach, B., Koc, O. N., Rizzieri, D. A., Wagner, J. E., ... & Kurtzberg, J. (2001). Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *New England Journal of Medicine*, 344(24), 1815-1822.
 - Lawrence, J.M., Schardien, K., Wigdahl, B. et al. Roles of neuropathology-associated reactive astrocytes: a systematic review. *acta neuropathol commun* 11, 42 (2023). <https://doi.org/10.1186/s40478-023-01526-9>
 - Lee, S., Kim, J. H., Kim, J. H., Seo, J. W., Han, H. S., Lee, W. H., ... & Suk, K. (2011). Lipocalin-2 Is a chemokine inducer in the central nervous system: role of chemokine ligand 10 (CXCL10) in lipocalin-2-induced cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 286(51), 43855-43870.
 - Lee, S., Park, J. Y., Lee, W. H., Kim, H., Park, H. C., Mori, K., & Suk, K. (2009). Lipocalin-2 is an autocrine mediator of reactive astrocytosis. *Journal of Neuroscience*, 29(1), 234-249.
 - Lee, Y. S., Lin, C. Y., Jiang, H. H., DePaul, M., Lin, V. W., & Silver, J. (2013). Nerve regeneration restores supraspinal control of bladder function after complete spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 33(26), 10591-10606.
 - LEPSKI, G.; JANNES, C. E.; NIKKHAH, G. & BISCHOFBERGER, J. (2013). cAMP promotes the differentiation of neural progenitor cells in vitro via modulation of voltage-gated calcium channels. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 155. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00155>
 - Li, L., Adnan, H., Xu, B., Wang, J., Wang, C., Li, F., & Tang, K. (2015). Effects of transplantation of olfactory ensheathing cells in chronic spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *European Spine Journal*, 24, 919-930.
 - Li, N., & Leung, G. K. (2015). Oligodendrocyte Precursor Cells in Spinal Cord Injury: A Review and Update. *BioMed research international*, 2015, 235195. <https://doi.org/10.1155/2015/235195>
 - Liddelow S. A., Guttenplan K. A., Clarke L. E., Bennett F. C., Bohlen C. J., Schirmer L., et al.. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481-487. [10.1038/nature21029](https://doi.org/10.1038/nature21029)
 - Liddelow S.A., Guttenplan K.A., Clarke L.E., Bennett F.C., Bohlen C.J., Schirmer L., Bennett M.L., Münch A.E., Chung W.-S., Peterson T.C., et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. (2017). 541:481-487. doi: 10.1038/nature21029.
 - Liddelow, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, 46(6), 957-967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
 - Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., et al. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481-487. doi: 10.1038/nature21029
 - Liu, C., Zhao, X. M., Wang, Q., Du, T. T., Zhang, M. X., Wang, H. Z., ... & Meng, F. G. (2023). Astrocyte-derived SerpinA3N promotes neuroinflammation and epileptic seizures by activating the NF-κB signaling pathway in mice with temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroinflammation*, 20(1), 161.
 - Liu, M. T., Keirstead, H. S., & Lane, T. E. (2001). Neutralization of the chemokine CXCL10 reduces inflammatory cell invasion and demyelination and improves neurological function in a viral model of multiple sclerosis. *The Journal of Immunology*, 167(7), 4091-4097.
 - Luster, A. D., & Ravetch, J. V. (1987). Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *The Journal of experimental medicine*, 166(4), 1084-1097.
 - Malekzadeh, H., Golpayegani, M., Ghodsi, Z., Sadeghi-Naini, M., Asgardoost, M., Baigi, V., ... & Rahimi-Movaghar, V. (2022). Direct cost of illness for spinal cord injury: a systematic review. *Global spine journal*, 12(6), 1267-1281.

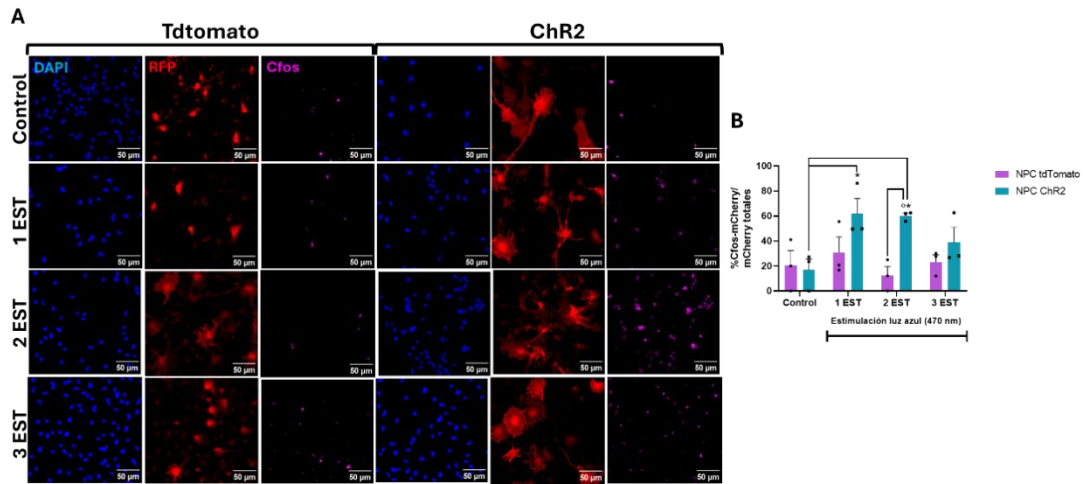
- Mason, C. A., Edmondson, J. C., and Hatten, M. E. (1988). The extending astroglial process: development of glial cell shape, the growing tip and interactions with neurons. *J. Neurosci.* 8, 3124–3134. doi: 10.1523/JNEUROSCI.08-09-03124.1988
- McKeon, R. J., Schreiber, R. C., Rudge, J. S., & Silver, J. (1991). Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 11(11), 3398–3411.
- McKeon, R. J., Schreiber, R. C., Rudge, J. S., and Silver, J. (1991). Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J. Neurosci.* 11, 3398–3411. doi: 10.1523/JNEUROSCI.11-11-03398.1991
- McKerracher, L., & Rosen, K. M. (2015). MAG, myelin and overcoming growth inhibition in the CNS. *Frontiers in molecular neuroscience*, 8, 51.
- Mekhail, M., Almazan, G., & Tabrizian, M. (2012). Oligodendrocyte-protection and remyelination post-spinal cord injuries: a review. *Progress in neurobiology*, 96(3), 322–339.
- Miller-Rhodes, P. (2022). A Guide to Neural Stem Cell Markers. *Biocompare*. Retrieved from <https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/592536-A-Guide-to-Neural-Stem-Cell-Markers/>
- Milosevic, J., Juch, F., Storch, A. et al. Low extracellular calcium is sufficient for survival and proliferation of murine mesencephalic neural precursor cells. *Cell Tissue Res* 324, 377–384 (2006). <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0147-3>
- Mondello, S. E., Young, L., Dang, V., Fishedick, A. E., Tolley, N. M., Wang, T., ... & Moritz, C. T. (2023). Optogenetic spinal stimulation promotes new axonal growth and skilled forelimb recovery in rats with sub-chronic cervical spinal cord injury. *Journal of Neural Engineering*, 20(5), 056005.
- Morgan, J. I., & Curran, T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual review of neuroscience*, 14(1), 421–451.
- Mothe, A. J., & Tator, C. H. (2012). Advances in stem cell therapy for spinal cord injury. *The Journal of clinical investigation*, 122(11), 3824–3834.
- Nakamura, M., Okada, S., Toyama, Y., & Okano, H. (2005). Role of IL-6 in spinal cord injury in a mouse model. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 28, 197–203.
- Nash, B., Thomson, C. E., Lington, C., Arthur, A. T., McClure, J. D., McBride, M. W., & Barnett, S. C. (2011). Functional duality of astrocytes in myelination. *Journal of Neuroscience*, 31(37), 13028–13038.
- Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L. III., and Strohl, W. R. (2017). Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. *BioDrugs* 31, 317–334. doi: 10.1007/s40259-017-0234-5
- Nave KA (2010a) Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468: 244–252
- Nave KA (2010b) Myelination and the trophic support of long axons. *Nat Rev Neurosci* 11: 275–283
- Nectow, A. R., & Nestler, E. J. (2020). Viral tools for neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(12), 669–681.
- Nieuwenhuys, R. (1964). Comparative anatomy of the spinal cord. *Progress in brain research*, 11, 1–57.
- Norenberg MD, Smith J, Marcillo A (2004) The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J Neurotrauma* 21: 429–440
- Oberheim, N. A., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 814, 23–45. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_3
- Oh, J. W., Schwiebert, L. M., & Benveniste, E. N. (1999). Cytokine regulation of CC and CXC chemokine expression by human astrocytes. *Journal of neurovirology*, 5(1), 82–94.
- ONO, K.; SUZUKI, H.; YAMAMOTO, R.; SAHASHI, H.; TAKIDO, Y. & SAWADA, M. (2017). Optogenetic control of cell differentiation in channelrhodopsin-2-expressing OS3, a bipotential glial progenitor cell line. *Neurochemistry International*, 104, 49–63. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.12.022>
- Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., ... & Daley, G. Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451(7175), 141–146.
- Petersen, E. D., Sharkey, E. D., Pal, A., Shafau, L. O., Zenchak-Petersen, J., Peña, A. J., ... & Hochgeschwender, U. (2022). Restoring function after severe spinal cord injury through bioluminescent-optogenetics. *Frontiers in neurology*, 12, 792643.
- Piatkevich, K. D., & Verkhusha, V. V. (2011). Guide to red fluorescent proteins and biosensors for flow cytometry. *Methods in cell biology*, 102, 431–461. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374912-3.00017-1>
- Prabhakar V, Capila I, Bosques CJ, Pojasek K, Sasisekharan R (2005a) Chondroitinase ABC I from *Proteus vulgaris*: cloning, recombinant expression and active site identification. *Biochem J* 386: 103–112
- Prabhakar V, Raman R, Capila I, Bosques CJ, Pojasek K, Sasisekharan R (2005b) Biochemical characterization of the chondroitinase ABC I active site. *Biochem J* 390: 395–405

- Rahmsdorf, H. J., Schönthal, A., Angel, P., Litfin, M., Rütger, U., & Herrlich, P. (1987). Posttranscriptional regulation of c-fos mRNA expression. *Nucleic acids research*, 15(4), 1643-1659.
- Rao, M. S., & Mayer-Proschel, M. (1997). Glial-restricted precursors are derived from multipotent neuroepithelial stem cells. *Developmental biology*, 188(1), 48-63.
- Raper, J., and Mason, C. (2010). Cellular strategies of axonal pathfinding. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a001933. doi: 10.1101/cshperspect.a001933
- Ren Y., Ao Y., O'Shea T. M., Burda J. E., Bernstein A. M., Brumm A. J., et al.. (2017). Ependymal cell contribution to scar formation after spinal cord injury is minimal, local and dependent on direct ependymal injury. *Sci. Rep.* 7:41122. 10.1038/srep41122
- Rodríguez-Berdini, L., Ferrero, G. O., Bustos Plonka, F., Cardozo Gizzi, A. M., Prucca, C. G., Quiroga, S., & Caputto, B. L. (2020). The moonlighting protein c-Fos activates lipid synthesis in neurons, an activity that is critical for cellular differentiation and cortical development. *The Journal of biological chemistry*, 295(26), 8808–8818. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010129>
- Rodríguez-Berdini, L., Ferrero, G. O., Plonka, F. B., Gizzi, A. M. C., Prucca, C. G., Quiroga, S., & Caputto, B. L. (2020). The moonlighting protein c-Fos activates lipid synthesis in neurons, an activity that is critical for cellular differentiation and cortical development. *Journal of Biological Chemistry*, 295(26), 8808-8818.
- Rothaug M., Becker-Pauly C., Rose-John S. (2016). The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 1863(6 Pt A), 1218–1227. 10.1016/j.bbamcr.2016.03.018
- Ruschel J, Bradke F (2018) Systemic administration of epothilone D improves functional recovery of walking after rat spinal cord contusion injury. *Exp Neurol* 306: 243–249
- Ruschel J, Hellal F, Flynn KC, Dupraz S, Elliott DA, Tedeschi A, Bates M, Sliwinski C, Brook G, Dobrindt K et al (2015) Axonal regeneration. Systemic administration of epothilone B promotes axon regeneration after spinal cord injury. *Science* 348: 347–352
- Sabre, L., Tomberg, T., Körv, J., Kepler, J., Kepler, K., Linnamägi, Ü., & Asser, T. (2016). Brain activation in the chronic phase of traumatic spinal cord injury. *Spinal Cord*, 54(1), 65-68.
- Scanziani, M., & Häusser, M. (2009). Electrophysiology in the age of light. *Nature*, 461(7266), 930-939.
- Schildge, S., Bohrer, C., Beck, K., & Schachtrup, C. (2013). Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (71), 50079. <https://doi.org/10.3791/50079>
- Schindler, C., & Darnell Jr, J. E. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annual review of biochemistry*, 64(1), 621-652.
- Schwab, M. E., & Strittmatter, S. M. (2014). Nogo limits neural plasticity and recovery from injury. *Current opinion in neurobiology*, 27, 53-60.
- Selzer, M., Clarke, S., Cohen, L., Kwakkel, G., & Miller, R. (2014). *Neural Repair and Rehabilitation*. Cambridge University Press
- Seternes, O. M., Sørensen, R., Johansen, B., Loennechen, T., Aarbakke, J., & Moens, U. (1998). Synergistic increase in c-fos expression by simultaneous activation of the ras/raf/map kinase-and protein kinase A signaling pathways is mediated by the c-fos AP-1 and SRE sites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1395(3), 345-360.
- SHEN, S.; BRYANT, K. D.; BROWN, S. M.; RANDELL, S. H. & ASOKAN, A. (2011). Terminal NLinked Galactose Is the Primary Receptor for Adeno-associated Virus 9. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13532-13540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.210922>
- Shen, Y., Campbell, R. E., Côté, D. C., & Paquet, M. E. (2020). Challenges for therapeutic applications of opsin-based optogenetic tools in humans. *Frontiers in neural circuits*, 14, 542693.
- Shigetomi, E., Saito, K., Sano, F. & Koizumi, S. Aberrant calcium signals in reactive astrocytes: a key process in neurological disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 20, PMC6413203 (2019).
- Shigetomi, E., Saito, K., Sano, F., & Koizumi, S. (2019). Aberrant calcium signals in reactive astrocytes: a key process in neurological disorders. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 996.
- Silvestro, S., Bramanti, P., Trubiani, O., & Mazzon, E. (2020). Stem cells therapy for spinal cord injury: an overview of clinical trials. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 659.
- Simpson RK Jr, Baskin DS, Dudley AW, Bogue L, Rothenberg F (1991) The influence of long-term nifedipine or indomethacin therapy on neurologic recovery from experimental spinal cord injury. *J Spinal Disord* 4: 420–427
- Sofroniew, M. V. & Vinters, H. V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 7–35 (2010)
- Sofroniew, M. V. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 249–263. doi: 10.1038/nrn3898
- Son, E. Y., Ichida, J. K., Wainger, B. J., Toma, J. S., Rafuse, V. F., Woolf, C. J., & Eggan, K. (2011). Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell stem cell*, 9(3), 205-218.

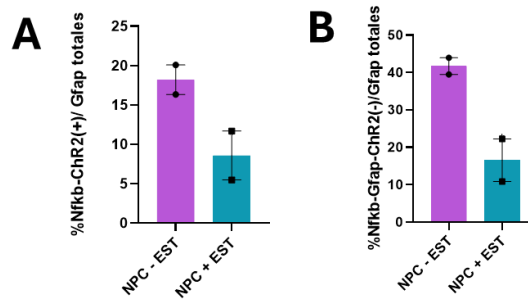
- Stirling DP, Khodarahmi K, Liu J, McPhail LT, McBride CB, Steeves JD, Ramer MS, Tetzlaff W (2004) Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. *J Neurosci* 24: 2182–2190
- STROH, A.; TSAI, H. C.; WANG, L. P.; ZHANG, F.; KRESSEL, J.; ARAVANIS, A.; SANTHANAM, N.; DEISSEROTH, K.; KONNERTH, A. & SCHNEIDER, M. B. (2011). Tracking stem cell differentiation in the setting of automated optogenetic stimulation. *STEM CELLS*, 29(1), 78-88. <https://doi.org/10.1002/stem.558>
- Sugar O., Gerard R. W. (1940). Spinal cord regeneration in the rat. *J. Neurophysiol.* 3, 1–19. [10.1152/jn.1940.3.1.1](https://doi.org/10.1152/jn.1940.3.1.1)
- Suo, Q., Deng, L., Chen, T., Wu, S., Qi, L., Liu, Z., He, T., Tian, H. L., Li, W., Tang, Y., Yang, G. Y., & Zhang, Z. (2023). Optogenetic Activation of Astrocytes Reduces Blood-Brain Barrier Disruption via IL-10 In Stroke. *Aging and disease*, 14(5), 1870–1886. <https://doi.org/10.14336/AD.2023.0226>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*, 126(4), 663-676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *cell*, 131(5), 861-872.
- Tan, A. M., Zhang, W., and Levine, J. M. (2005). NG2: a component of the glial scar that inhibits axon growth. *J. Anat.* 207, 717–725. doi: 10.1111/j.1469-7580.2005.00452.x
- Tang, T., Yuan, L., Wang, K., & Zhao, M. (2021). Unfavorable Effects of Fixatives on the Fluorescence Intensity and Biological Functions of Fluorescent Proteins in HEK293T Cells and Transgenic Mice.
- Tator, C. H. (1995). Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain pathology*, 5(4), 407-413.
- Taub, D. D., Lloyd, A. R., Conlon, K., Wang, J. M., Ortaldo, J. R., Harada, A., ... & Oppenheim, J. J. (1993). Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *The Journal of experimental medicine*, 177(6), 1809-1814.
- Taylor, X., Cisternas, P., Jury, N. et al. Activated endothelial cells induce a distinct type of astrocytic reactivity. *Commun Biol* 5, 282 (2022). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03237-8>
- Teh D. B. L., Prasad A., Jiang W., Ariffin M. Z., Khanna S., Belorkar A., et al. (2017). Transcriptome Analysis Reveals Neuroprotective aspects of Human Reactive Astrocytes induced by Interleukin 1β. *Sci. Rep.* 7:13988. [10.1038/s41598-017-13174-w](https://doi.org/10.1038/s41598-017-13174-w)
- Thompson, A. C., Wise, A. K., Hart, W. L., Needham, K., Fallon, J. B., Gunewardene, N., ... & Richardson, R. T. (2020). Hybrid optogenetic and electrical stimulation for greater spatial resolution and temporal fidelity of cochlear activation. *Journal of Neural Engineering*, 17(5), 056046.
- Tkach, M., & Théry, C. (2016). Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell*, 164(6), 1226-1232.
- Toettcher, J. E., Weiner, O. D., & Lim, W. A. (2013). Using optogenetics to interrogate the dynamic control of signal transmission by the Ras/Erk module. *Cell*, 155(6), 1422-1434.
- Uhlin-Hansen, L., Wik, T., Kjellén, L., Berg, E., Forsdahl, F., and Kolset, S. O. (1993). Proteoglycan metabolism in normal and inflammatory human macrophages. *Blood* 82, 2880–2889. doi: 10.1182/blood.v82.9.2880.bloodjournal8292880
- Vesce, S., Rossi, D., Brambilla, L., & Volterra, A. (2007). Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation. *International review of neurobiology*, 82, 57-71.
- Wang, X., Botchway, B. O., Zhang, Y., Yuan, J., & Liu, X. (2019). Combinational treatment of bioscaffolds and extracellular vesicles in spinal cord injury. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 81.
- Wanner I. B., Anderson M. A., Song B., Levine J., Fernandez A., Gray-Thompson Z., et al.. (2013). Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 33, 12870–12886. [10.1523/JNEUROSCI.2121-13.2013](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2121-13.2013)
- White, N., & Sakiyama-Elbert, S. E. (2019). Derivation of specific neural populations from pluripotent cells for understanding and treatment of spinal cord injury. *Developmental Dynamics*, 248(1), 78-87.
- Witiw, C. D., & Fehlings, M. G. (2015). Acute spinal cord injury. *Clinical Spine Surgery*, 28(6), 202-210.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2024). Spinal cord injury. Visto en Abril 26, 2024. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury#:~:text=Las%20estimaciones%20mundiales%20indican%20que,la%20m%C3%A9dula%20es%20pinal%20en%202021>
- Woźniak W. (1993). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF): role in neuronal development and survival. *Folia morphologica*, 52(4), 173–181.
- Wu X, Xu XM (2016) RhoA/Rho kinase in spinal cord injury. *Neural Regen Res* 11: 23–27

- Yang N. (2015). An overview of viral and nonviral delivery systems for microRNA. *International journal of pharmaceutical investigation*, 5(4), 179–181. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.167646>
- Yang, H., Liang, Z., Li, J., Cheng, X., Luo, N., & Ju, G. (2006). Optimized and efficient preparation of astrocyte cultures from rat spinal cord. *Cytotechnology*, 52(2), 87–97. <https://doi.org/10.1007/s10616-006-9033-4>
- Yang, T., Dai, Y., Chen, G., & Cui, S. (2020). Dissecting the dual role of the glial scar and scar-forming astrocytes in spinal cord injury. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 78.
- Yin, K. J., Cirrito, J. R., Yan, P., Hu, X., Xiao, Q., Pan, X., ... & Lee, J. M. (2006). Matrix metalloproteinases expressed by astrocytes mediate extracellular amyloid- β peptide catabolism. *Journal of Neuroscience*, 26(43), 10939-10948.
- Yizhar, O., Fenno, L. E., Davidson, T. J., Mogri, M., & Deisseroth, K. (2011). Optogenetics in neural systems. *Neuron*, 71(1), 9-34.
- Young, H. E., Mancini, M. L., Wright, R. P., Smith, J. C., Black Jr, A. C., Reagan, C. R., & Lucas, P. A. (1995). Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Developmental dynamics*, 202(2), 137-144.
- Yu, H., Yang, S., Li, H., Wu, R., Lai, B., & Zheng, Q. (2023). Activating Endogenous Neurogenesis for Spinal Cord Injury Repair: Recent Advances and Future Prospects. *Neurospine*, 20(1), 164–180. <https://doi.org/10.14245/ns.2245184.296>
- Zattoni, M., Mearelli, M., Vanni, S., Colini Baldeschi, A., Tran, T. H., Ferracin, C., ... & Legname, G. (2022). Serpin signatures in prion and Alzheimer’s diseases. *Molecular Neurobiology*, 59(6), 3778-3799.
- Zeng, C. W., & Zhang, C. L. (2023). Neuronal regeneration after injury: a new perspective on gene therapy. *Frontiers in neuroscience*, 17, 1181816. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1181816>
- Zhang, F. et al. *Cell* 147, 1446–1457 (2011).
- Zhu, M., Lan, Z., Park, J., Gong, S., Wang, Y., & Guo, F. (2024). Regulation of CNS pathology by Serpina3n/SERPINA3: The knowns and the puzzles. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 50(2), e12980.

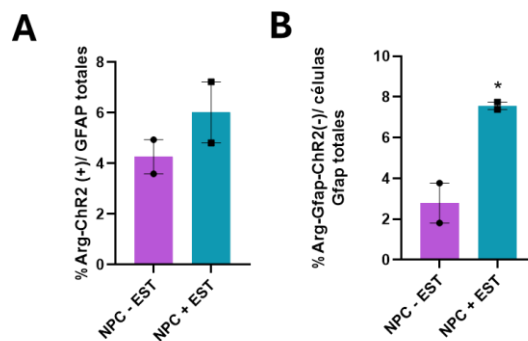
7 ANEXO



Anexo 1. Activación de la Chr2 mediante estimulación optogénica con LED. (A) Microscopía de fluorescencia de NPC-Chr2 O Tdtomato marcadas con RFP y c-Fos. (B) Cuantificación del porcentaje de c-Fos sobre el total de células NPC-Chr2. Condiciones: células control, 1, 2 o 3 estimulaciones BL LED transducidas con Chr2 o con Tdtomato. Los datos representan la media \pm SEM. * p -value < 0.05 comparado con control sin estimular. p -value < 0.05 comparado con control Tdtomato. (ANOVA; $n = 3$). EST: estimulación.



Anexo 2. Efecto de la estimulación optogénica sobre NF- κ B de astrocitos diferenciados de NPC-Chr2 (A) y NPC sin transducir (B). Porcentaje de NF- κ B en células GFAP+. Los datos representan la media \pm SEM. No hay diferencias significativas; (T-test; $n = 2$). EST: estimulación



Anexo 3. Efecto de la estimulación optogenética sobre la arginasa de astrocitos diferenciados de NPC-ChR2 (A) y NPC sin transducir (B). Porcentaje de Arginasa en células GFAP+. Los datos representan la media \pm SEM. No hay diferencias significativas; (T-test; n = 2). EST: estimulación. Arg= arginasa.