



Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural
Grado en Biotecnología

***Precondicionamiento de progenitores neurales con un
conjugado de poliglutamato del Fasudil para el
tratamiento de la lesión medular aguda***

Curso Académico 2018-2019
Valencia, Julio de 2019

Autora:

Dña. Lucía Inés Torrijos Saiz

Tutora:

Prof. Dra. Esther Giraldo Reboloso

Cotutora externa:

Dra. Victoria Moreno Manzano

Acceso público

TITTLE

Preconditioning of neural progenitors with a Fasudil polyglutamate conjugate for treatment of acute spinal cord injury.

TÍTULO

Precondicionamiento de progenitores neurales con un conjugado de poliglutamato del Fasudil para el tratamiento de la lesión medular aguda.

TÍTOL

Precondicionament de progenitors neurals amb un conjugat de poliglutamats del Fasudil per al tractament de la lesió medular aguda.

ABSTRACT

Spinal cord injury (SCI) leads to a series of pathological events in which axons shear and degenerate, causing necrosis and inflammation at the injury site. Moreover, the surrounding tissue suffers from a progressive destruction that ends with the formation of the glial scar and thus, the failure of axon regeneration.

The inability of regeneration of the central nervous system responds to a change in the proteomic profile of the extracellular matrix at the injury site. Reactive astrocytes, macrophages and oligodendrocytes present at the glial scar are the responsible of the activation of a large amount of biochemical and cellular cascades by the release of cytokines, chondroitin sulfate proteoglycan molecules and myelin associated inhibitors.

Cell therapy based on the transplantation of neural progenitor cells is, on one hand, a promising approach to restore neuroregeneration. These stem cells are thought to provide a permissive extracellular matrix while giving tropic support for regeneration.

On the other hand, several molecular targets have been considered with the aim of slowing down the neurodegeneration at the lesion site and overcoming the pathological cascade. The myelin associated inhibitors, for instance, are mediated by the Rho/ROCK signalling pathway, where the activation of the GTPases of the Rho family modulates actin fibers formation. This results in the in the repression of neurite sprouting by collapse of the growth cone. Fasudil is an isoquinoline derivative which acts as a selective inhibitor of ROCK (Rho kinase). By blocking the Rho/ROCK pathway, fasudil is able to promote neuronal regeneration, opening the possibility to treat SCI with a successful functional recovery. Furthermore, we have enhanced cell therapy through a Fasudil polyglutamate (PGA) conjugate which presents a particular structure that enhances stability and allows a sustained release of the drug after its internalization.

In this project, we studied the effect of Fasudil and PGA Fasudil conjugates on neural progenitors in an *in vitro* model of SCI. After the observation that the fasudil conjugate shows an effect on neurite growth and the activation of pathways related to axonal growing, we studied the effect of a combinatory approach by means of an *in vivo* transplant of neural progenitors that were preconditioned with the conjugated.

KEY WORDS

Spinal cord injury, Fasudil, Rho/ROCK, neuroregeneration, neural progenitor cells, cell therapy.

RESUMEN

La lesión medular (LM) conduce a una serie de eventos patológicos en los cuales los axones se desgarran y degeneran, causando necrosis e inflamación en el sitio de lesión. Además, el tejido colindante sufre una destrucción progresiva que termina con la formación de la cicatriz glial y, por tanto, el fallo en la regeneración axonal.

La incapacidad de regeneración del sistema nervioso central responde al cambio en el perfil proteómico de la matriz extracelular en el sitio de lesión. Los astrocitos reactivos, macrófagos y oligodendrocitos presentes en la cicatriz glial son los responsables de la activación de una gran cantidad de cascadas bioquímicas y celulares mediante la liberación de citoquinas, proteínas condroitin sulfato proteoglicano e inhibidores asociados a mielina.

La terapia celular basada en el trasplante de células progenitoras neurales es, por un lado, una aproximación prometedora para recuperar la neuroregeneración. Estas células progenitoras proporcionarían una matriz celular permisiva mientras que ofrecerían soporte trófico para la regeneración.

Por otro lado, varias dianas moleculares han sido consideradas con el fin de frenar la neurodegeneración en el sitio de lesión y superar la cascada patológica. Los inhibidores asociados a mielina, por ejemplo, son mediados por la ruta de señalización Rho/ROCK, en la cual la activación de las GTPasas de la familia Rho modula la formación de las fibras de actina. Esto resulta en la represión del crecimiento de las neuritas debido a un colapso del cono de crecimiento. El Fasudil es un derivado de la isoquinolina el cual actúa como inhibidor selectivo de ROCK (Rho kinase). Mediante el bloqueo de la ruta Rho/ROCK, el fasudil es capaz de promover la regeneración neuronal, abriendo la posibilidad de tratar la lesión medular con una recuperación funcional exitosa. Más allá de este hecho, hemos implementado la terapia celular a través del uso de un conjugado de poliglutamato (PGA) del Fasudil, el cual presenta una estructura particular que incrementa su estabilidad y permite una liberación sostenida del fármaco tras su internalización.

En este proyecto se estudiará el efecto del Fasudil y el PGA Fasudil sobre los progenitores neurales en un modelo *in vitro* de LM. Después de observar que el conjugado de Fasudil muestra un efecto en el crecimiento de las neuritas y la activación de rutas relacionadas con el crecimiento axonal, hemos estudiado el efecto de una aproximación combinatoria mediante un trasplante *in vivo* de progenitores neurales que fueron precondicionados con el conjugado.

PALABRAS CLAVE

Lesión medular, Fasudil, Rho/ROCK, neuroregeneración, células progenitoras neurales, terapia celular.

Autora:

Dña. Lucía Inés Torrijos Saiz

Tutora:

Prof. Dra. Esther Giraldo Reboloso

Cotutora externa:

Dra. Victoria Moreno Manzano

Localidad y fecha:

Valencia, Julio de 2019

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, debo agradecer a la Dra. Victoria Moreno Manzano por acogerme en su equipo de investigación y darme la oportunidad de participar en uno de los proyectos que está desarrollando en su laboratorio.

A su vez, me gustaría darle las gracias a mi tutora, la Dra. Esther Giraldo, por enseñarme a trabajar en un laboratorio y exigir siempre el máximo de mí en cada una de las tareas asignadas.

También quiero agradecer a Mara, Ana, Eric, Marina y Pablo, por ser un gran equipo de trabajo. Gracias por responder siempre a mis preguntas y ayudarme a encontrar los materiales en el laboratorio cuando no sabía en qué nevera buscar.

Por último, me gustaría agradecer a toda mi familia, mi hermana, mi padre, mi abuela, y en especial a mi madre, porque, sin su apoyo en los momentos difíciles, este trabajo no habría sido posible. Gracias por confiar siempre en mí y motivarme para seguir adelante.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA/BIS: Acrilamida/bisacrilamida
AMPc: Adenosina monofosfato cíclica
APS: Persulfato amónico
bFGF: Basic fibroblast growth factor (factor de crecimiento fibroblástico básico)
BSA: Bovine serum albumine (Albúmina de suero bovino)
DMEM/F-12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DTT: Dithiothreitol
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
ELA: Esclerosis lateral amiotrófica
EGF: Factor de crecimiento epidérmico
epSPCs: Ependymal stem progenitor cells
FL: Fasudil libre
GDP: Guanosín difosfato
GTP: Guanosín trifosfato
HE: Hematoxilina-eosina
HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
LM: Lesión medular
LPA: Ácido lipofosfatídico
MAG: Myelin associated glycoprotein (Glicoproteína asociada a mielina)
NAC: N-acetilcisteína
NSPCs: Neural stem progenitor cells
Omgp: Oligodendrocytic myelin glycoprotein (Glicoproteína oligodendrocítica de mielina)
PBS: Phosphate buffered saline (Tampón fosfato salino)
PGA: Poliglutamato
PGA-SS-Fasudil: Conjugado de Fasudil
PVDF: Polifluoruro de vinilideno
ROCK: Rho kinase
ROL: Rolipram
SCI: Spinal cord injury
SDS: Dodecilsulfato sódico
SNC: Sistema nervioso central
SNP: Sistema nervioso periférico
TBS: TRIS-buffered saline (Solución salina tamponada con TRIS)
TEMED: Tetrametiletildiamina
TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano
ULA: Ultra Low attachment

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas:

- Tabla 1. Tratamientos con Fasudil libre, Fasudil conjugado y Rolipran.
Tabla 2. Anticuerpos utilizados para el ensayo de diferenciación espontánea de epSPCs.
Tabla 3. Anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica.
Tabla 4. Anticuerpos utilizados para Western Blot de muestras de homogeneizados de médula.

Figuras:

- Figura 1. Esquema de la fisiopatología de la lesión medular en cada una de sus fases: aguda, subaguda, intermedia y crónica.
Figura 2. Cascada de señalización Rho/ROCK.
Figura 3. Funciones neuronales y mecanismos patológicos modulados por la vía Rho/ROCK.
Figura 4. Diagrama de los mecanismos de regeneración y “sprouting” de los axones tras una LM.
Figura 5. Efectos del trasplante de células progenitoras para el tratamiento de la lesión medular
Figura 6. Representación del nicho donde se encuentran las NSCs y las epSPCs.
Figura 7. Estructura química del Fasudil (a), Hydroxifasudil (b) y Dimetilfasudil (c).
Figura 8. Esquema representativo de las fases obtenidas tras la centrifugación.
Figura 9. Cultivo primario de epSCPs como neuroesferas.
Figura 10. Disposición de los cortes transversales de médula en un portaobjetos para su análisis histológico.
Figura 11. Cortes histológicos de médula de rata teñidos con HE.
Figura 12. Morfología y localización de las motoneuronas.
Figura 13. Área de tejido desestructurada.
Figura 14. Identificación de quistes.
Figura 15. Área ocupada por las epSPCs trasplantadas (células GFP positivas).
Figura 16. Inmunocitoquímica de epSPCs para cada tratamiento.
Figura 17. Efecto del Fasudil libre, Fasudil conjugado a PGA y Rolipram sobre la longitud de las prolongaciones de epSPCs *in vitro*.
Figura 18. Inmunocitoquímica de epSPCs para cada tratamiento en un modelo de LM *in vitro*.
Figura 19. Efecto del Fasudil libre, Fasudil conjugado a PGA y Rolipram sobre la longitud de las prolongaciones de epSPCs en un modelo *in vitro* de LM.
Figura 20. Inmunocitoquímica de epSPCs precondicionadas y diferenciadas espontáneamente.
Figura 21. Porcentaje de células positivas para cada uno de los marcajes utilizados (A) Tuj, C) Olig2 y E) GFAP) y sus respectivos porcentajes de cambio frente al control (B, D, F).
Figura 22. Número medio de motoneuronas presentes en una loncha de tejido de médula.
Figura 23. Cortes transversales de médula teñidos con HE correspondientes al epicentro de la lesión y las zonas adyacentes a éste (rostral y caudal).
Figura 24. Porcentaje de área ocupada por tejido degenerado normalizada respecto al área total de cada loncha.
Figura 25. Número de motoneuronas y área de tejido degenerado en mm² a lo largo de los 4 mm de médula analizados.
Figura 26. Localización de quistes en cortes transversales de médula teñidos con HE correspondientes al epicentro de la lesión.
Figura 27. Área media y número de quistes presentes en una loncha de médula espinal.
Figura 28. Inmunohistoquímica de lonchas transversales de médula de rata.

Figura 29. Área media ocupada por células GFP positivas.

Figura 30. Vía de señalización PI3/Akt.

Figura 31. Expresión de pAKT y pAMPK según el acondicionamiento de las epSPCs inyectadas en cada grupo de animales.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	VI
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA LM.....	1
1.2. MECANISMO MOLECULAR DEL FALLO EN LA REGENERACIÓN DEL SNC	1
1.3. TRATAMIENTO DE LA LM	4
1.4. TERAPIA CELULAR	4
1.5. TERAPIA FARMACOLÓGICA	6
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. EXPERIMENTACIÓN <i>IN VITRO</i>	9
3.1.1. Cultivo primario de células progenitoras endimarias (epSPCs).....	9
3.1.2. Mantenimiento del cultivo.....	10
3.1.3. Tratamiento de los cultivos	10
3.1.3.1. Fasudil	10
3.1.3.2. LPA	10
3.1.3.3. Rolipram	11
3.1.4. Diferenciación espontánea de epSPCs	11
3.1.5. Inmunocitoquímica	11
3.2. EXPERIMENTACIÓN <i>IN VIVO</i>	12
3.2.1. Procedencia y mantenimiento de los animales. Modelo de LM	12
3.2.2. Grupos experimentales y terapia celular.....	13
3.2.3. Preparación de los tejidos.....	13
3.2.4. Tinción de HE.....	13
3.2.5. Inmunohistoquímica.....	15
3.2.6. Western Blot.....	16
3.2.7. Análisis estadístico.....	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON FASUDIL Y PGA-SS-FASUDIL SOBRE LA LONGITUD DE NEURITAS <i>IN VITRO</i>	18
4.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON FASUDIL Y PGA-SS-FASUDIL SOBRE LA LONGITUD DE NEURITAS EN UN MODELO <i>IN VITRO</i> DE LM.....	20
4.3. EL FASUDIL Y EL PGA-SS-FASUDIL AFECTAN A LA DIFERENCIACIÓN DE EPSPCS EN UN MODELO DE LM <i>IN VITRO</i>	23
4.4. EFECTO DEL TRASPLANTE DE EPSPCS PRECONDICIONADAS CON FASUDIL LIBRE Y PGA-SS-FASUDIL SOBRE EL NÚMERO DE MOTONEURONAS Y ÁREA DESESTRUCTURADA EN UN MODELO DE LM <i>IN VIVO</i>	26
4.5. EFECTO DEL TRASPLANTE DE EPSPCS PRECONDICIONADAS CON FASUDIL LIBRE Y PGA-SS-FASUDIL SOBRE LOS QUISTES EN UN MODELO DE LM <i>IN VIVO</i>	29
4.6. LOCALIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS EPSPCS PRECONDICIONADAS CON FASUDIL LIBRE Y PGA-SS-FASUDIL EN LA MÉDULA TRAS EL TRASPLANTE EN UN MODELO DE LM <i>IN VIVO</i>	30
4.7. SEÑALIZACIÓN EN UN MODELO DE LM <i>IN VIVO</i> TRAS EL TRANSPLANTE DE EPSPCS PRECONDICIONADAS CON FASUDIL LIBRE Y PGA-SS-FASUDIL	32
5. CONCLUSIONES.....	35
6. REFERENCIAS.....	36

1. INTRODUCCIÓN

1.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN MEDULAR

La lesión medular (LM) es una patología devastadora la cual acarrea un amplio espectro de disfunciones neurológicas, siendo algunas de ellas la pérdida de la función motora y sensorial, espasticidad, dolor neuropático o disfunción de la vejiga e intestino (Galeiras Vázquez, 2016). El desarrollo de la patología de la LM cubre un extenso período, pudiendo agruparse en tres fases.

La primera de ellas comienza tras la lesión o impacto y se conoce como lesión aguda primaria. En ella se produce un daño mecánico que se expande desde el centro del impacto causando necrosis a los tejidos circundantes (Hulsebosch, 2002). Este fenómeno de muerte celular se caracteriza por una hinchazón del soma, pérdida de definición del citoplasma y agregación de la cromatina. A su vez, se da la ruptura y degeneración de los axones presentes en el sitio de lesión, los cuales se retraen y demielinizan, dificultando un futuro reencuentro entre ellos, así como la formación de conexiones sinápticas (Figura 1). Por otra parte, la barrera hematoencefálica es susceptible de ruptura bajo la presión ejercida por una lesión traumática. El daño ocasionado sobre la barrera se traduce en la pérdida de las uniones gap entre las células endoteliales que la conforman. Este hecho deriva en una invasión de sangre en la médula, la cual puede acarrear, entre otras consecuencias, el desarrollo de isquemia, un aumento del estrés oxidativo e hipoxia. Estos factores complican la regeneración tisular en la zona dañada, facilitando la formación de una cavidad de lesión (Tran *et al.*, 2018).

La fase secundaria se caracteriza por la expansión de la lesión debido a la inducción de la apoptosis en el tejido circundante y al proceso inflamatorio. Las células del sistema inmune se activan y se da un período de gliosis en el que se generan especies reactivas de oxígeno y citoquinas pro-inflamatorias que contribuyen al daño tisular (David and Kroner, 2011). A partir de este momento, la lesión avanzará progresivamente hacia una fase crónica de formación y maduración de la cicatriz glial, compuesta principalmente por astrocitos hipertróficos y proteoglicanos (Fernández-Klett and Priller, 2014).

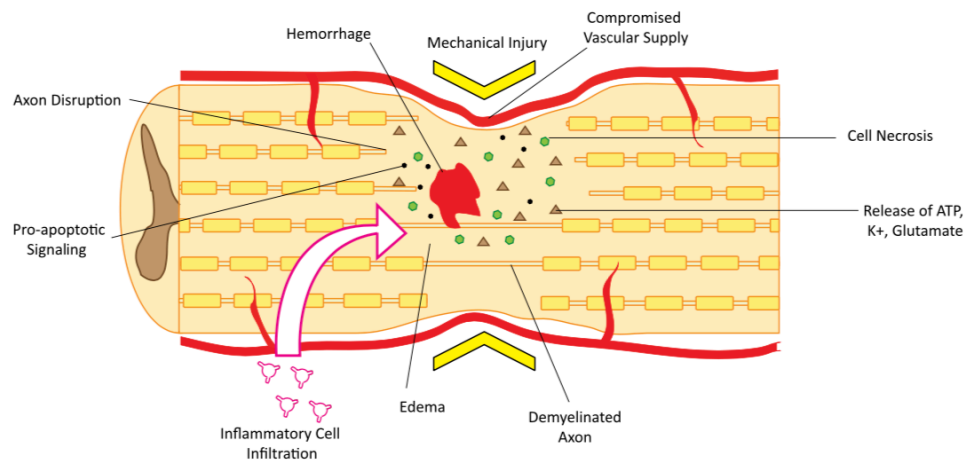
1.2. MECANISMO MOLECULAR DEL FALLO EN LA REGENERACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La incapacidad del sistema nervioso central (SNC) para regenerarse es una característica adquirida durante el desarrollo del individuo. La formación del sistema nervioso se basa en la creación de conexiones neuronales entre células que pueden encontrarse a grandes distancias. De este modo, es necesario que las neuritas posean una mínima capacidad de prolongación de forma que sean capaces de establecer conexiones sinápticas entre sí (Van Niekerk *et al.*, 2016).

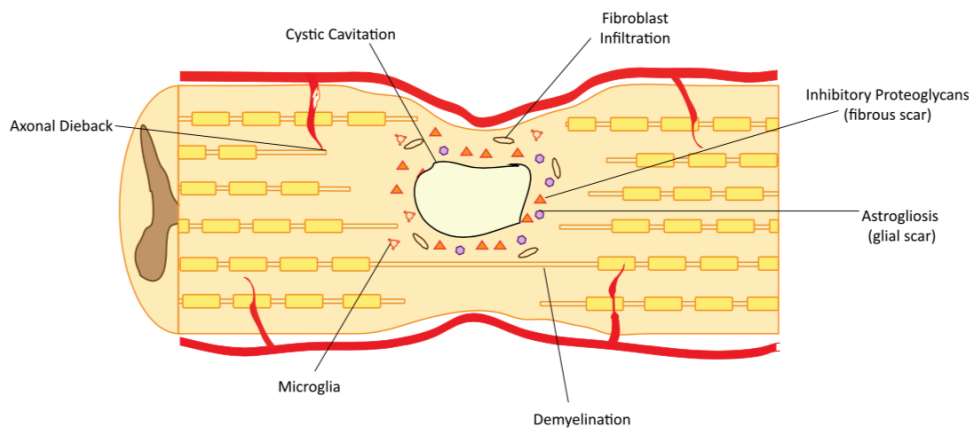
La regeneración de una lesión en el sistema nervioso periférico (SNP) tiene lugar gracias a la activación de ciertas rutas de supervivencia celular y la regulación de genes asociados a la regeneración. El mecanismo de reparación comienza con la modificación del potencial de membrana debido a un incremento del calcio intracelular (Van Niekerk *et al.*, 2016). A continuación, se activan diversas cascadas de señalización, las cuales transmiten la información de la lesión a lo largo del cuerpo neuronal. Por último, se incita la formación de un nuevo cono de crecimiento mediante la degradación y reconstrucción de los extremos de los microtúbulos (Van Niekerk *et al.*, 2016).

Sin embargo, la regeneración es, también, dependiente del perfil proteómico de la matrix extracelular. Cuando se produce una lesión en el sistema nervioso central, las fibras de mielina que recubren los axones son dañadas y éstos quedan expuestos a un ambiente en que se encuentran moléculas inhibitorias del crecimiento axonal. Dichas moléculas inducen, entre otras, la activación de la vía RhoA/ROCK (Figura 2), ruta que frena el desarrollo de las neuritas (Fujita and Yamashita, 2014).

Acute (0-48 Hours)



Subacute (2-14 Days)



Intermediate (2 Weeks-6 Months) / Chronic (>6 Months)

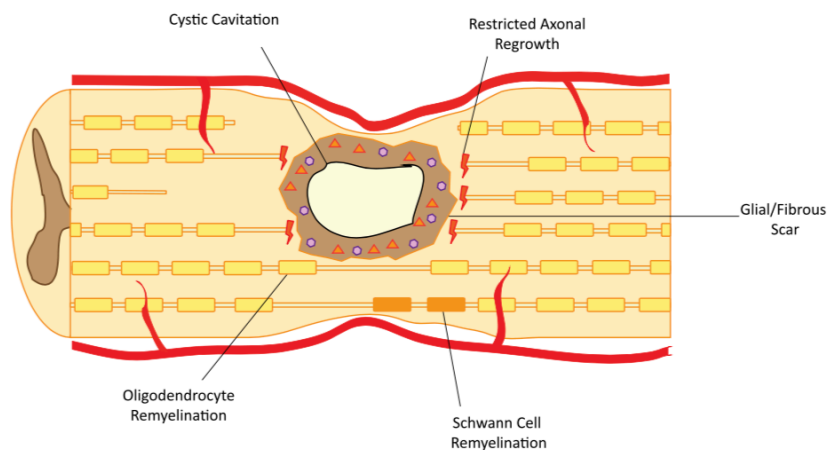


Figura 1. Esquema de la fisiopatología de la lesión medular en cada una de sus fases: aguda, subaguda, intermedia y crónica. (Ahuja CS and Fehlings M., 2016)

Rho es una molécula de bajo peso molecular, perteneciente a la subfamilia de GTPasas de Ras. Mayoritariamente, se encuentra en el citoplasma en su configuración activa o inactiva, unida a GTP o unida a GDP, respectivamente (Liu *et al.*, 2015). De esta forma, Rho actúa como un interruptor

molecular, jugando un papel importante en la determinación de la morfología celular, la polaridad celular y la dinámica del citoesqueleto de actina (Hall and Nobes, 2000).

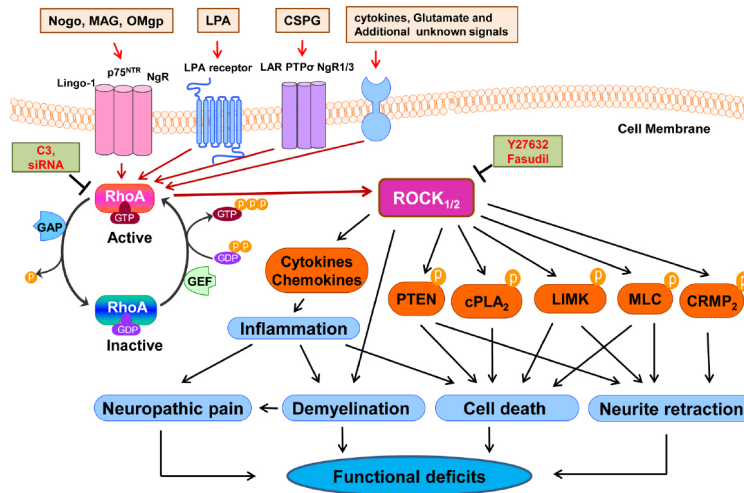


Figura 2. Cascada de señalización Rho/ROCK (Wu and Xu, 2016).

La activación de Rho responde a la activación de receptores de membrana, como receptores tirosinquinasa, o de receptores intracelulares. Esta activación viene dada en el caso de la lesión medular por la unión de factores inhibidores asociados a mielina, entre otros, a su correspondiente receptor. Algunos de estos inhibidores son la glicoproteína asociada a mielina (MAG), la glicoproteína oligodendrocítica de mielina (Omgp) y Nogo. Una vez Rho ha sido activada, ésta se une a la quinasa asociada a Rho (ROCK), la cual presenta un mecanismo de autoinhibición que se desactiva con la interacción. Dicha unión tiene lugar en el dominio alfa hélice de ROCK y es la responsable del desencadenamiento de diversas cascadas de señalización (Tan, H. *et al.*, 2011).

Una de las varias rutas de regulación posterior de esta vía es la fosforilación directa de la cadena ligera de miosina por ROCK, lo cual significa una mayor interacción entre la miosina y la actina, derivando en una reorganización del citoesqueleto (Narumiya *et al.*, 2009). Las reformas en el citoesqueleto celular conllevan una desestabilización de la estructura que acaba con el colapso del cono de crecimiento y la retracción de las neuritas. La activación de la vía Rho/ROCK supone, por lo tanto, un mecanismo de frenado en la extensión y regeneración de los axones (Nelson, 2009). Además, la activación de esta ruta está relacionada también con la degeneración neuronal, con un incremento en la infiltración de astrocitos reactivos y del estrés oxidativo, así de como fallos en las funciones sinápticas (Koch *et al.*, 2018) (Figura 3).

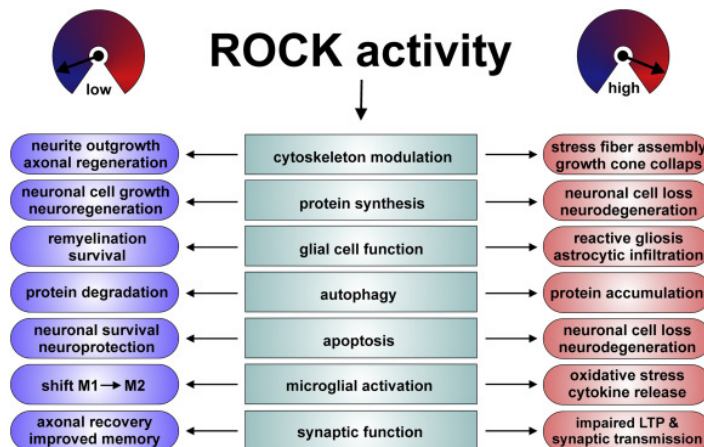


Figura 3. Funciones neuronales y mecanismos patológicos modulados por la vía Rho/ROCK (Koch *et al.*, 2018)

1.3. TRATAMIENTO DE LA LESIÓN MEDULAR

La recuperación de la capacidad motora en el SNC tras una LM se da cuando las conexiones sinápticas perdidas se recuperan. Esto puede darse por medio de dos vías. Una opción sería el crecimiento de nuevos axones a partir de neuronas sanas, las cuales serían capaces de crear nuevos circuitos que compensen la pérdida de otros, lo cual se denomina “sprouting” (Figura 4). Sin embargo, para ello debemos suponer que dichos axones pueden cruzar la zona lesionada o que encuentran un camino alternativo, evitándola (Liu *et al.*, 2010).

No obstante, existe otra opción, la cual se basa en que las células consiguen regenerar sus axones dañados, recuperando así las conexiones que se habían perdido debido a la lesión (Liu *et al.*, 2010) (Figura 4). Durante mucho tiempo, se consideró que los axones que habían formado un cono de retracción debido al ambiente inhibitorio de la cicatriz glial, no eran capaces de volver a extender un cono de crecimiento. Sin embargo, nuevas líneas de investigación están abiertas al hecho de que esta regeneración sea posible (Silver and Miller, 2004.). El sistema nervioso central adulto mantiene un delicado equilibrio de factores promotores del crecimiento y factores inhibidores de éste (Deumens, 2005). La modificación de dicho balance hacia un entorno más propicio para el crecimiento axonal podría suponer una diana terapéutica potente en el tratamiento de la lesión medular.

Con respecto al tratamiento de la LM, estabilizar la médula y recuperar la homeostasis son los principales objetivos de los tratamientos en fase aguda, mientras que los tratamientos a largo plazo se centran en reducir los efectos secundarios que acarrea una lesión de estas magnitudes (Tran *et al.*, 2018). A pesar de que la fase más estable para el estudio de terapias frente a la LM es el período crónico, dado que los procesos inflamatorios se ven reducidos y la comparación entre individuos puede resultar más homogénea (Dalamagkas *et al.*, 2018), nuestro proyecto se centra en la búsqueda de una solución aplicable en etapas tempranas tras la lesión.

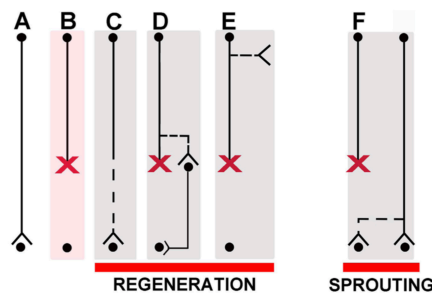


Figura 4. Diagrama de los mecanismos de regeneración y “sprouting” de los axones tras una LM (Tuszynski and Steward, 2012).

1.4. TERAPIA CELULAR

El trasplante de células madre/progenitoras neurales (NSPCs) ha mostrado resultados prometedores en la reparación y regeneración de los tejidos neurales dañados y en la restauración asociada de déficits neuronales (Salewski *et al.*, 2015). Las NSPCs incluyen células madre multipotentes presentes en la capa periventricular subependimal y la zona subgranular del giro dentado del cerebro, así como en la regiones ependimarias limitantes con el canal central de la médula espinal (epSPCs) (Volaveric *et al.*, 2013). Las NSPCs representan un candidato ideal para la terapia celular de la LM basándose en las mejoras funcionales y la ausencia de transformaciones malignas tras el trasplante observadas, ofreciendo un tipo celular seguro y relevante para su aplicación clínica.

Tras la LM, las epSPCs proliferan y migran a la zona lesionada produciendo nuevos progenitores de oligodendrocitos (OPCs) (Meletis *et al.*, 2008). El trasplante agudo de epSPCs sin diferenciar a partir de donantes con LM u OPCs diferenciadas *in vitro* en un modelo de rata de contusión severa de la médula espinal, produce una recuperación de la locomoción significativa una semana tras la lesión (Moreno-Manzano, 2009). El trasplante de epSPCs proporciona soporte tráfico, modula positivamente la respuesta inmune local y reduce la expresión de receptores asociados a neurodegeneración y daño

neuropático, promoviendo la protección neuronal y la supervivencia. Interesantemente, una línea de epSPCs de feto humano inmortalizada (Requejo-Aguilar *et al.*, 2017, Gómez-Villafuertes *et al.*, 2015), ha sido el foco central de muchas terapias celulares desarrollados por Neural Stem Inc (USA) y ha sido aplicada en dos ensayos clínicos de fase II (SCI and ALS ClinicalTrials.gov: NCT01348451, NCT02163876). No obstante, a pesar de que la fase I ha declarado que no existen efectos adversos del tratamiento, los datos funcionales no han sido publicados todavía.

A pesar del prometedor futuro de la terapia celular, los resultados sugieren que es improbable que dicha terapia aporte por ella sola la suficiente ganancia de función en pacientes humanos debido a las complicaciones biológicas causadas por la LM. La aplicación terapéutica de NSPCs para LM incluye la sustitución de neuronas dañadas y células gliales, la secreción de factores tróficos, la regulación de la gliosis y la formación de la cicatriz glial, la prevención de la formación de quistes y la implementación de la elongación de los axones. Sin embargo, aún son necesarios esfuerzos hacia la activación axonal intrínseca. Debido a que la LM activa la vía Rho/ROCK con el fin de inhibir el crecimiento axonal y el “sprouting” (Fujita and Yamashita, 2014), esta ruta ha sido considerada una diana terapéutica válida en el tratamiento de la LM (Watzlawick *et al.*, 2014).

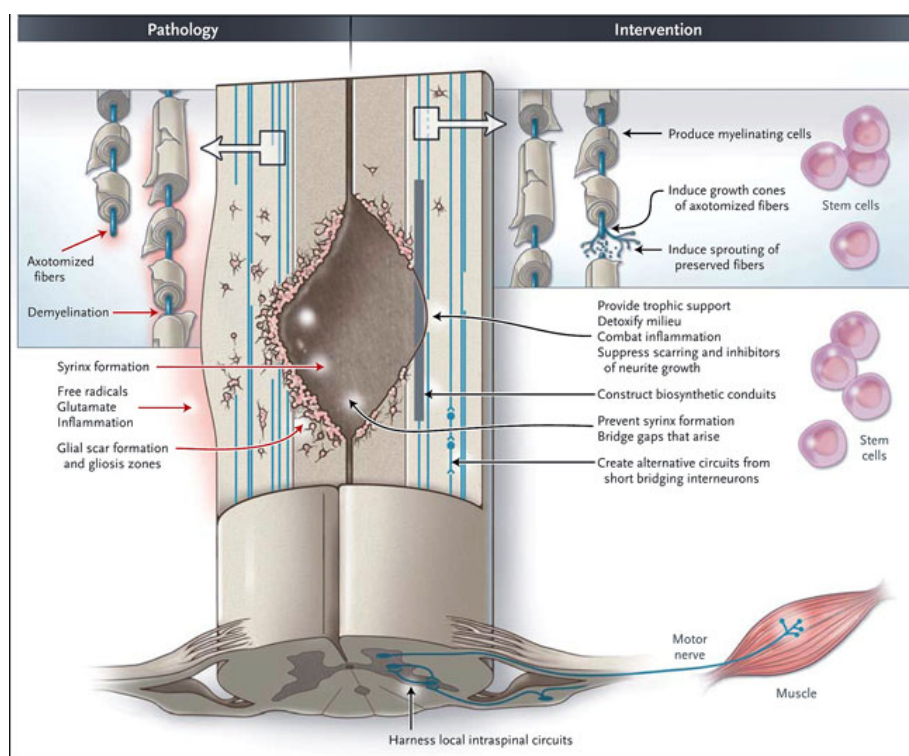


Figura 5. Efectos del trasplante de células progenitoras para el tratamiento de la lesión medular (Snyder *et al.*, 2012).

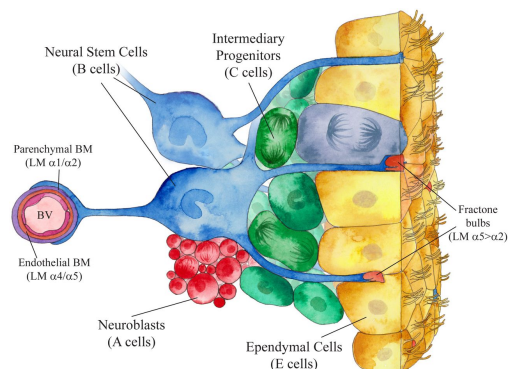


Figura 6. Representación del nicho donde se localizan las NSCs y las epSPCs (Nascimento *et al.*, 2018).

1.5. TERAPIA FARMACOLÓGICA

Cabe destacar que debido a la complejidad de la LM y a la variabilidad en la progresión de la lesión entre los individuos, la terapia celular por sí sola puede no ser suficiente, lo que abre la puerta al estudio de una terapia combinatoria que ejerza una función de neuroprotección, pero a su vez sea capaz de regenerar el tejido dañado (Ahuja and Fehlings, 2016). Es por ello, que diversas terapias celulares traslacionales han optado por la combinación de células madre con factores de crecimiento que induzcan la regeneración axonal o compuestos que inhiban las rutas de señalización activadas cuando se produce una LM (Dalamagkas *et al.*, 2018). Como se ha explicado anteriormente, una de las rutas que se activan cuando se produce una LM es la vía Rho/ROCK. Por esta razón, una de las muchas líneas de investigación en terapia farmacológica para el tratamiento de la LM está enfocada en la búsqueda de compuestos inhibidores de ROCK.

No obstante, una de las desventajas de la inhibición de ROCK mediante terapia farmacológica es la falta de especificidad que poseen los compuestos inhibidores hacia la diana. Esto conlleva la regulación de otras quinasas no implicadas en la vía diana, lo cual puede enmascarar el efecto del inhibidor utilizado (Davies *et al.*, 2000). Es por ello que en las últimas décadas se han desarrollado un gran número de compuestos inhibidores de ROCK, pertenecientes a diferentes categorías químicas, con el fin de aumentar la especificidad de la inhibición (Koch *et al.*, 2018).

El Fasudil (1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-homopiperazine hydrochloride) es un derivado de la isoquinolina, el cual actúa como inhibidor selectivo de ROCK (Impellizzeri *et al.*, 2012). La estructura química de este compuesto consta de un anillo de isoquinolina conectado mediante un grupo sulfonilo a un anillo de homopiperazina (Figura 7). El Fasudil posee una constante de inhibición (K_i) de 0.33 μM para ROCK, sin embargo afecta también a otras quinasas como PKA (Koch *et al.*, 2018). El metabolito activo del Fasudil se denomina Hidroxifasudil (Figura 7) y presenta una acción más potente que el Fasudil ($K_i=0.17 \mu\text{M}$), con la desventaja de que inhibe también otras quinasas (Shimokawa, 2002). Modificando la estructura del Fasudil, se han obtenido compuestos derivados más potentes, como el Dimetilfasudil (Figura 7), con una $K_i=1.6 \text{ nM}$ (Sasaki *et al.* 2002), sin embargo el Fasudil es el único derivado de isoquinolina que ha sido aprobado como inhibidor de ROCK para su uso en humanos (Koch *et al.*, 2018).

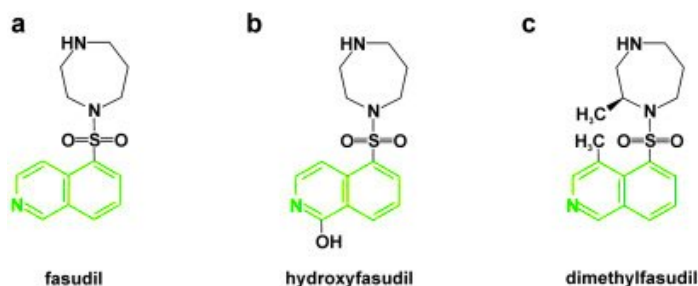


Figura 7. Estructura química del Fasudil (a), Hydroxyfasudil (b) y Dimetilfasudil (c) (Koch *et al.*, 2018).

El Fasudil ha demostrado ser un fármaco seguro tras superar la fase III de ensayos clínicos en pacientes que sufrieron un accidente cardiovascular isquémico (Shibuya *et al.*, 2005). Sin embargo, la eficacia del Fasudil observada fue mucho menor a la esperada, razón por la cual se terminó el estudio clínico. El Fasudil posee una reducida vida media en la circulación, pues es susceptible del metabolismo hepático, así como una baja capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (Mueller *et al.*, 2005). Debido a estas deficiencias, actualmente se investiga el uso de *nanocarriers*, los cuales proporcionarían una mayor especificidad al compuesto, a la vez que aumentarían la biodisponibilidad de éste en la corriente circulatoria (Grupta *et al.*, 2013; Fukuta *et al.*, 2016).

Gracias al desarrollo de la nanomedicina polimérica, es posible la conjugación de un polímero, el cual actuaría como *carrier*, al fármaco en cuestión (Duncan and Gaspar, 2011). Esta conjugación permitiría la protección del fármaco frente a la degradación temprana, la liberación controlada de éste y la

superación de barreras físicas y químicas, características que podría suponer un aumento en su eficacia. Uno de los *carriers* más utilizados en la conjugación de fármacos es el basado en cadenas de poliglutamato (PGA). El PGA es un polímero de amplio uso en la investigación biomédica gracias a sus características de biodegradabilidad y biocompatibilidad (Duro-Castano *et al.*, 2014).

El laboratorio de Regeneración Tisular y neuronal del Centro de Investigación Príncipe Felipe, en colaboración con el grupo de investigación de Polímeros Terapéuticos, ha desarrollado un conjugado de PGA con el Fasudil (compuesto protegido bajo patente) con el fin de incrementar la eficacia del tratamiento con Fasudil aplicado a la LM. Dicho conjugado aumenta la vida media del compuesto en el organismo, permitiendo su liberación de una manera más controlada y prolongada en el tiempo. El objetivo principal de nuestro proyecto es, pues, evaluar la eficacia del conjugado del Fasudil frente al fármaco libre en el acondicionamiento de epSPCs para el tratamiento de la LM.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Estudios previos en el laboratorio de Regeneración Tisular y neuronal del Centro de Investigación Príncipe Felipe han mostrado que el trasplante con epSPCs muestra un beneficio funcional de rescate de la actividad motora tras una lesión medular. Por otro lado, resultados previos en la literatura describen un papel regenerador mediado por el inhibidor de ROCK, Fasudil, en modelos de LM. En este trabajo proponemos la combinación de ambas estrategias a través del trasplante de epSPCs previamente condicionadas, por tratamiento *ex vivo*, con Fasudil.

Con el fin de implementar la eficacia de dicho tratamiento, se ha desarrollado un conjugado polimérico del Fasudil (PGA-SS-Fasudil), el cual permite la liberación del compuesto de manera más prolongada en el tiempo. En este proyecto, se pretende estudiar los efectos de dicho conjugado en el preconditionamiento de epSPCs, para lo cual se han marcado los siguientes objetivos:

1. Evaluar el efecto del Fasudil y el PGA-SS-Fasudil sobre el crecimiento de neuritas de progenitores neurales en un modelo de lesión medular *in vitro*.
2. Evaluar el efecto del Fasudil y el PGA-SS-Fasudil sobre la diferenciación espontánea de progenitores neurales en un modelo de lesión medular *in vitro*.
3. Evaluar el efecto de una aproximación combinatoria mediante el trasplante de progenitores neurales preconditionados con PGA-SS-Fasudil o con Fasudil libre en un modelo *in vivo* de lesión medular.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. EXPERIMENTACIÓN *IN VITRO*

3.1.1. Cultivo primario de células progenitoras endimarias (epSPCS)

El cultivo primario de células progenitoras endimarias se realizó a partir de un homogeneizado de médula espinal de ratas Sprague Dawley-Tg (GFP) 2BalRrc neonatales de entre 3 y 4 días. Para los ensayos *in vitro* se utilizó ratas homocigotas eGFP^{-/-}, mientras que para los ensayos *in vivo* se utilizaron ratas eGFP^{+/+}. Los animales estuvieron en todo momento sujetos al cuidado y mantenimiento especificado por el Comité Ético de Experimentación Animal del Centro de Investigación Príncipe Felipe, el cual se desarrolla acorde al Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero.

El sacrificio de las ratas neonatas tuvo lugar mediante decapitación y fue realizado por el personal capacitado para ello. Para el procedimiento de extracción de la médula espinal, se cortó la piel de la espalda con unas tijeras, se retiró el cojín de grasa y se separaron las escápulas. A continuación, se procedió al corte de las vértebras haciendo uso de unas tijeras de microcirugía y con la ayuda de una lupa. La médula se extrajo con unas pinzas y se colocó en una placa Petri P6 que contenía medio de lavado (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12, Lonza) suplementado con 0,39% hepes (Sigma), 0,05 % NaHCO₃ (Sigma), 0,09% glucosa (Sigma) y antibiótico formado por penicilina y estreptomina a 0,5X (P/S, Sigma)).

La placa se trasladó al laboratorio de cultivos con el fin de trabajar desde este momento bajo una campana de flujo laminar. El procesamiento inicial de la muestra consta de dos etapas. En primer lugar, se realizó una disgregación mecánica, la cual consistió en cortar la médula en trozos pequeños con unas tijeras de microcirugía. En segundo lugar, se pasó la muestra por puntas de pipeta de diferentes tamaños (de mayor amplitud a menor amplitud) para la obtención de un homogeneizado. La muestra se recogió en un Eppendorf y se centrifugó 4 minutos a 1000 rpm. El resultado de la centrifugación fue una separación en tres fases, la cual se muestra en la Figura 8. La fase superior de color rosáceo corresponde al medio de lavado y se aspira con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío. En la fase inferior, de color blanquecino, se encuentran las meninges y restos de tejido que hemos podido arrastrar en la extracción, por lo que es descartada.

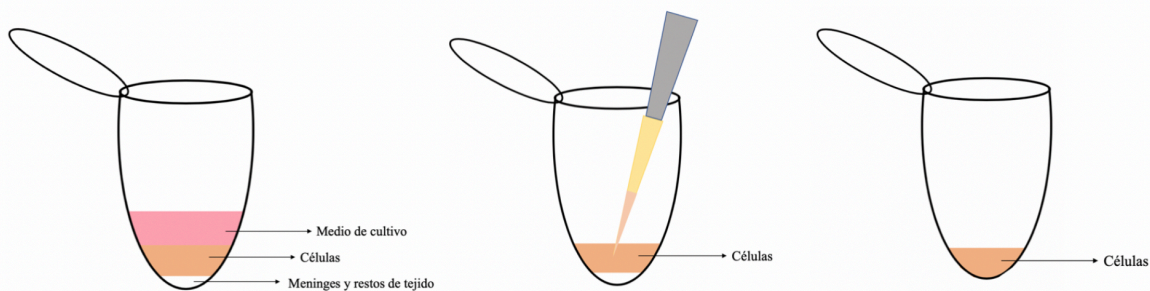


Figura 8. Esquema representativo de las fases obtenidas tras la centrifugación. La fase que contiene el medio de cultivo se retira y se recoge en un Eppendorf nuevo la fase anaranjada que contiene las células.

La fase intermedia aparece con un tono anaranjado y es la que nos interesa, pues contiene el homogeneizado de la médula. Traspasamos la fase intermedia a un Eppendorf nuevo y añadimos solución de lavado para repetir el paso de centrifugación. Por último, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en medio de cultivo completo (NeuroCultTM Proliferation Medium (STEMCELL) suplementado con NeuroCultTM Proliferation Supplement, 40 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF, Invitrogen), 40 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, Invitrogen), 1X P/S y 2 g/ml de heparina (Sigma)). La solución resuspendida se sembró en

una placa Petri P100 con medio de cultivo completo (aproximadamente 8-10 ml) y se observó al microscopio para visualizar las células. La placa se incubó en un incubador con 5% de CO₂ a 37°C y se controló el crecimiento celular diariamente.

Tras una semana, el cultivo se pasa a una placa multipocillo tipo ULA (Ultra Low Attachment) para su cultivo en suspensión. Estas placas poseen una superficie tratada que permite el crecimiento de los progenitores neurales en forma de neuroesferas (Figura 9). El cultivo se observó diariamente mediante un microscopio invertido.

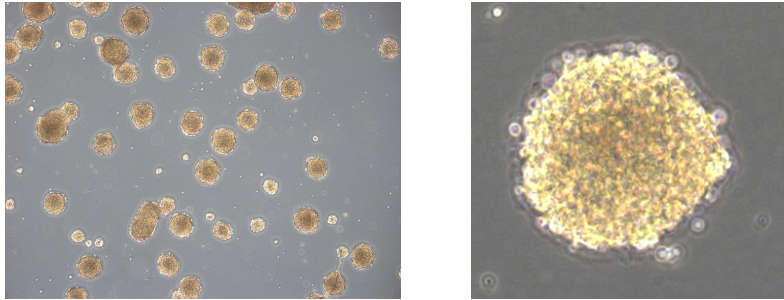


Figura 9. Cultivo primario de epSCPs como neuroesferas.

3.1.2. Mantenimiento del cultivo

Para realizar un mantenimiento del cultivo efectivo, es preciso evitar que las células alcancen un estado de confluencia. Por esta razón, el crecimiento del cultivo se revisó cada día hasta que éste alcanza alrededor del 80% de su potencial. En este momento, se disgregaron las células mecánicamente con una pipeta y con un tratamiento enzimático con Acutasa (StemPro Accutase® (Thermo Fisher)). Para saber el número de células que poseemos y cuántas queremos distribuir en cada placa nueva, se realizó un conteo en una cámara de Neubauer. En este conteo se utilizó Trypan Blue (Gibco) para descartar las células muertas, pues se observan azules al microscopio óptico. Una vez calculada la concentración de células que nos interesa sembrar y el tipo de placa a utilizar, se siembra el volumen deseado en el medio correspondiente según el tratamiento que queramos aplicar.

3.1.3. Tratamiento de los cultivos

3.1.3.1. Fasudil y PGA-SS-Fasudil

Los experimentos que se describen en este trabajo requieren un tratamiento específico sobre las células endimarias utilizadas. Como se ha descrito previamente, el Fasudil es un inhibidor de la vía de señalización Rho/ROCK, el cual ha sido identificado como un posible fármaco efectivo en el tratamiento de la LM. En los experimentos llevados a cabo, se pretende estudiar el efecto del conjugado de Fasudil desarrollado en el laboratorio (PGA-SS-Fasudil), comparándolo con el Fasudil libre. Para ello, se trató las epSPCs cultivadas con Fasudil libre, el cual representaremos como “FL”, así como con el conjugado de Fasudil, el cual aparecerá especificado como “PGA-SS-Fasudil”, ambos a diferentes concentraciones (50 y 100 μ M). Así pues, dichos tratamientos seguirán la siguiente nomenclatura: FL50, FL100, PGA-SS-Fasudil 50 y PGA-SS-Fasudil 100 (Tabla 1).

3.1.3.2. LPA

Las células se estimularon con ácido lisofosfatídico (LPA) (L7260, Sigma Aldrich) con el fin de activar la vía Rho/ROCK e inducir el colapso del cono de crecimiento y la retracción de las neuritas. Activando dicha vía en un cultivo celular tratamos de simular *in vitro* la activación de la vía Rho/ROCK que se produce en la LM (Sayas *et al.*, 2002)..

El LPA es un glicerofosfolípido bioactivo que estimula la cascada de señalización Rho/ROCK a través de su receptor específico LPAR. De esta manera, el LPA regula una amplia variedad de

respuestas celulares incluyendo el crecimiento, la migración y la morfología de las células (Frisca *et al.*, 2013). Además, el LPA afecta a la retracción de las neuritas mediante la reorganización de los microtúbulos del citoesqueleto de actina (Sayas *et al.*, 2002). El LPA, por tanto, ayuda en la creación de un modelo sobre el cual podemos testar los diferentes tratamientos que desean ponerse a punto, previamente a su estudio en modelos *in vivo*. La adición del LPA al medio se efectuó 24 horas después del tratamiento con FL o PGA-SS-Fasudil y se realizó a una concentración de 10 μM .

3.1.3.3. Rolipram

El Rolipram (0905, TOCRIS bioscience) es un inhibidor de la fosfodiesterasa-4, la cual regula el daño oxidativo, la neurodegeneración y la respuesta inflamatoria mediante la regulación de los niveles de adenosina monofosfato cíclica (AMPc). El Rolipram actúa como un activador de AMPc, suprimiendo la apoptosis neuronal mediante la regulación de la vía SIRT1/AKT (Li *et al.*, 2018). Representaremos los tratamientos con Rolipram como “ROL”, acompañado de la concentración a la que se encuentra, 0,5 o 1 μM .

Tabla 1. Tratamientos con Fasudil libre, Fasudil conjugado y Rolipram aplicados a las epSPCs.

Immunocitoquímica para ensayo de diferenciación	Immunocitoquímica para medida de longitud de neuritas	
Control	Control	FL100
LPA	LPA	PGA-SS-Fasudil 50
LPA FL50	LPA FL50	PGA-SS-Fasudil 100
LPA FL100	LPA FL100	LPA ROL 0,5
LPA PGA-SS-Fasudil 50	LPA PGA-SS-Fasudil 50	LPA ROL 1
LPA PGA-SS-Fasudil 100	LPA PGA-SS-Fasudil 100	ROL 0,5
	FL50	ROL 1

3.1.4. Diferenciación espontánea de epSPCs

Para el ensayo de diferenciación espontánea de epSPCs, las neuroesferas se disociaron con Acutasa según las instrucciones del proveedor y se sembraron en *coverslips*, los cuales habían sido previamente tratados con Matrigel, para que las células crecieran en adherencia.

El medio de diferenciación utilizado fue DMEM/F12, suplementado con 1mM NAC, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin, 2 mM de L-glutamina, 5 mM tampón HEPES, NaHCO_3 al 0.125 %, glucosa al 0.6 %, 0.025 mg/ml de insulina, 80 $\mu\text{g/ml}$ de apotransferrina, 16 nM de progesterona, 60 μM de putrescina, 24 nM de selenito de sodio y FBS al 1%. A continuación, se realizó una tinción mediante inmunocitoquímica, siguiendo el protocolo que se detalla más adelante.

3.1.5. Immunocitoquímica

Para realizar los diversos ensayos de inmunocitoquímica, se cultivaron epSPCs en adherencia sobre *coverslips* tratados con Matrigel. Tras aplicar los tratamientos previamente descritos de Fasudil libre, Fasudil conjugado y LPA, se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) frío al 4% durante 10 minutos dentro de una campana de gases seguido de 3 lavados con PBS 1X (tampón fosfato salino). 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% NGS (*Normal Goat Serum*) y 0,2% Tritón (Sigma). Esta solución de bloqueo se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente.

Los anticuerpos primarios (Tabla 2) fueron diluidos en una disolución de bloqueo formada por 99,8% PBS, 0,2% Tritón (Sigma) y 0,1 g BSA (Albúmina de Suero Bovino) y se incubaron toda la noche en una cámara fría a 4°C con una adecuada cámara de humedad para evitar la evaporación de la solución con el anticuerpo. Al día siguiente, se realizaron lavados de nuevo con PBS 1X y se añadió el anticuerpo secundario fluorescente (Tabla 2) diluido en la misma solución de bloqueo que el anticuerpo primario. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad.

Para el experimento de medición de longitud de las neuritas, se utilizó el anticuerpo Nestina como marcador de progenitores neurales, mientras que para el ensayo de diferenciación espontánea se hizo uso de un cóctel de tres anticuerpos: B III Tubulina, GFAP y Olig-2 (Tabla 2). Tras la incubación, se realizaron lavados de PBS 1X y una contratinción añadiendo DAPI (1:1000) durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con el objetivo de teñir los núcleos de las células de color azul. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS 1X de nuevo y los *coverslips* se montaron en portaobjetos de vidrio con líquido de montaje (Fluoromount, F4680, Southern Biotech). Una vez el líquido de montaje se secó, se tomaron imágenes en el microscopio de fluorescencia vertical (DM6000B, Leica) a 20X. Para el análisis de las imágenes, tanto de cuantificación de tipos celulares como de medición de la longitud de las neuritas, fue utilizado el software ImageJ.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en ensayos inmunocitoquímicos.

Anticuerpo primario	Dilución	Especie	Tipo celular que marca	Anticuerpo secundario	Dilución
B II Tubulin, MAB1637 (CHEMICON)	1:400	Mouse	Neuronas	OREGON GREEN 488 GOAT ANTIMOUSE, O6380, INVITROGEN	1:400
GFAP MAB360, (CHEMICON)	1:400	Chicken	Astrocitos	Anti-Chicken 647, A20449, ALEXA FLUOR	1:400
Olig-2 AB9610, (MILLIPORE)	1:400	Rabbit	Oligodendrocitos	ALEXA FLUOR 555 GOAT ANTI RABBIT, A21428, INVITROGEN	1:400
Nestina, ab6142, ABCAM	1:400	Mouse	Progenitores neurales	OREGON GREEN 488 GOAT ANTIMOUSE, O6380, INVITROGEN	1:400

3.2. EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO*

3.2.1. Procedencia y mantenimiento de los animales. Modelo de LM.

De la misma forma que las ratas utilizadas para los experimentos desarrollados *in vitro*, los animales utilizados en la experimentación *in vivo* llevada a cabo estuvieron sujetos en todo momento a cuidado y mantenimiento descrito por el Comité Ético de Experimentación Animal del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Real Decreto 53/2013). El modelo de LM *in vivo* se ha perfeccionado en este laboratorio en ratas Sprague Dawley, de aproximadamente 200 g) proporcionadas por Charles River and SD-Tg(GFP) 2BalRrrc from Rrrc (University of Missouri Columbia, Columbia, MO, USA). Estos animales se mantuvieron a condiciones de temperatura estándar con ciclos de luz/oscuridad controlados de 12 horas y acceso *ad libitum* a comida y bebida.

La LM se causó a los animales por una contusión severa (250 kdyn, “Infinite Horizon Impactor,”) en el segmento torácico T8 (Moreno-Manzano *et al.*, 2009). El procedimiento de la cirugía fue el siguiente. Treinta minutos antes de la cirugía se medicó al animal con Morfina (2.5 mg/kg sbc). A continuación, se indujo la anestesia y se lubricaron las córneas. Se realizó una incisión longitudinal

a la altura de la última costilla y se diseccionó la zona por planos. Después, se seccionaron las apófisis espinosas de T8 y T9 y se realizó una laminectomía para evitar que el contusor impacte el hueso. La pesa del contusor se colocó 5 mm por encima del tejido blando y se aplicó la fuerza controlada por un software. Finalmente se suturó al animal y se colocó sobre una almohadilla eléctrica durante la recuperación anestésica.

3.2.2. Grupos experimentales y terapia celular

Para el tratamiento de la lesión aguda, se pretrataron 2×10^6 epSPCs con Fasudil libre o PGA-SS-Fasudil $50 \mu\text{M}$ y se dejaron 24 horas. Inmediatamente tras la lesión, se administró por vía intratecal la suspensión celular preconditionada utilizando una pipeta Hamilton 30G a una velocidad de $4 \mu\text{l}/\text{min}$. Para realizar la inyección intratecal, se realizó una laminectomía parcial en la T3 que permitió la introducción del catéter a través de una perforación en la dura madre, hasta los segmentos dañados (T8). Los animales fueron sacrificados 8 semanas tras la LM.

Las ratas se dividieron de manera aleatoria en tres grupos, según el tratamiento aplicado:

- Grupo epSPCs: tras la lesión las ratas fueron trasplantadas con 2×10^6 de epSPCs ($n=7$).
- Grupo epSPCs+PGA-SS-Fasudil: tras la lesión las ratas fueron trasplantadas con epSPCs preconditionadas con PGA-SS-Fasudil ($n=6$)
- Grupo epSPCs+Fasudil libre: tras la lesión las ratas fueron trasplantadas con epSPCs preconditionadas con Fasudil libre ($n=5$)

3.2.3. Preparación de los tejidos

Para la preparación de los tejidos se administró a las ratas una sobredosis de pentobarbital de sodio ($100 \text{ mg}/\text{kg}$) vía intraperitoneal. Se perfundió a los animales con suero salino 0,9%, seguido de paraformaldehído 4% en PBS. La médula espinal se criopreservó en sacarosa 30% previamente a su inclusión en Tissue-Teck OCT (Sakura Finetek U.S.A). Para su posterior análisis histológico, se cortó un fragmento de 4 mm de la médula espinal que contuviera la lesión en su centro en un criostato a -20°C . Dicho fragmento se cortó a su vez en plano coronal (transversal) en lonchas de $10 \mu\text{m}$ de grosor. Estas lonchas se colocaron sobre un portaobjetos (10 lonchas en cada uno) y se almacenaron a -20°C hasta su procesado. La distribución de las 10 lonchas en un portaobjetos se realizó cada $50 \mu\text{m}$ (Figura 10).

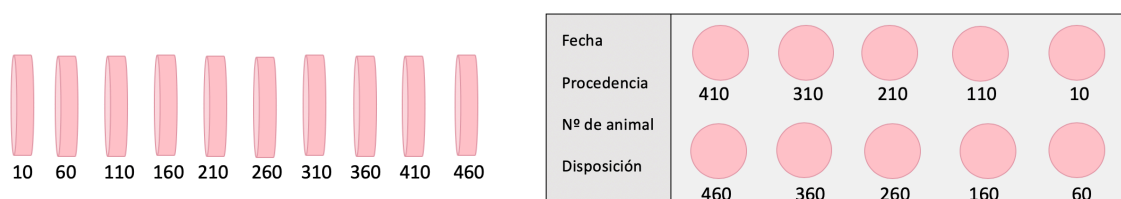
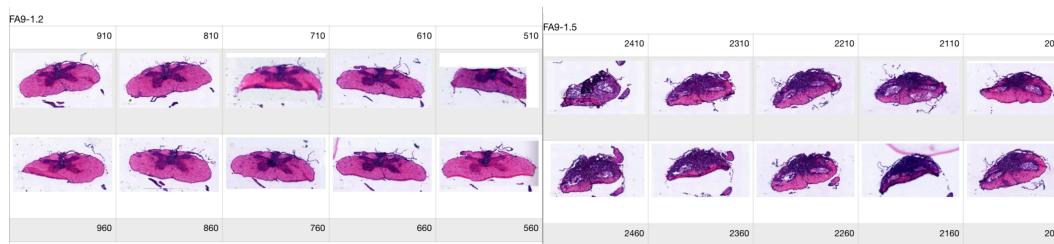


Figura 10. Disposición de los cortes transversales de médula en un portaobjetos para su análisis histológico. La numeración de la muestra hace referencia a la distancia en μm que representan si se considera 0 el punto en el que se comenzó a cortar los 4 mm de médula.

3.2.4. Tinción de Hematoxilina-Eosina (HE)

Para el análisis histológico mediante tinción de HE, se hidrataron las muestras usando una sucesión de diluciones de etanol y se realizó la tinción en un equipo automatizado siguiendo las instrucciones del proveedor (Figura 11).



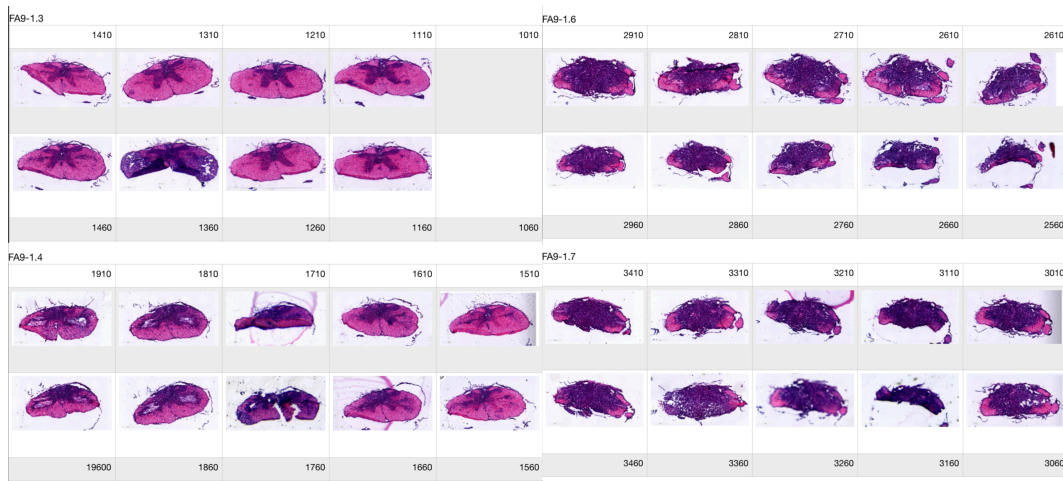


Figura 11. Cortes histológicos de médula de rata teñidos con HE. Las imágenes de los cortes se ordenaron en tablas de manera que se correspondieran con su localización en los portaobjetos. La numeración de cada corte hace referencia a la distancia en μm que representan si se considera 0 el punto en el que se comenzó a cortar los 5 mm de médula.

El primer análisis realizado con esta tinción fue el conteo de motoneuronas. Las motoneuronas son las células ChAT positivas localizadas en el asta ventral de la médula espinal, cuyas prolongaciones enervan los músculos (Jameson et al., 1950). El soma de estas células presenta una forma redondeada, ovoidal o triangular, pudiendo tener entre 3 y 6 dendritas. Su tamaño se encuentra entre los $40 \times 55 \mu\text{m}$ para las más grandes y los $19 \times 33 \mu\text{m}$ para las más pequeñas (Barber et al., 1984). La cantidad de motoneuronas se contabilizó en cada loncha siguiendo los criterios morfológicos y de tamaño mencionados. En la figura 12 se puede observar una ampliación de un corte transversal de médula de rata donde se han localizado algunas motoneuronas.

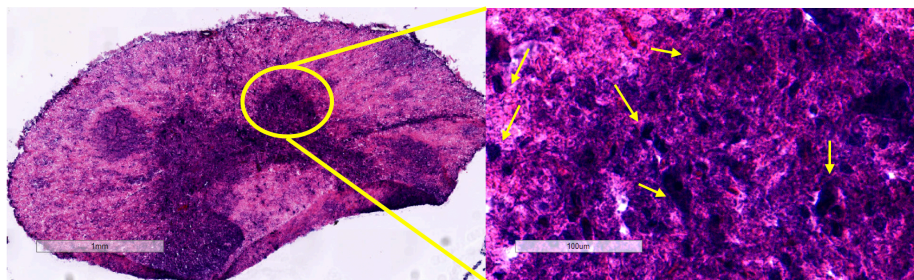


Figura 12. Morfología y localización de las motoneuronas. Corte transversal de médula de rata teñido con HE. A su derecha encontramos una ampliación en la que se puede ver la morfología de las motoneuronas con mayor claridad.

La tinción de HE permitió, además, medir la expansión de la desestructuración del tejido, guiándose por la estructura de las astas conformadas por la materia gris, las cuáles pueden observarse teñidas de morado. El área degenerada se midió con ayuda del software Fiji. Por último, se contabilizaron los quistes y se midió su área, calculándose el área media que poseen y el área que ocupan dichos quistes en la loncha. En la figura 14 se señalan algunos quistes.

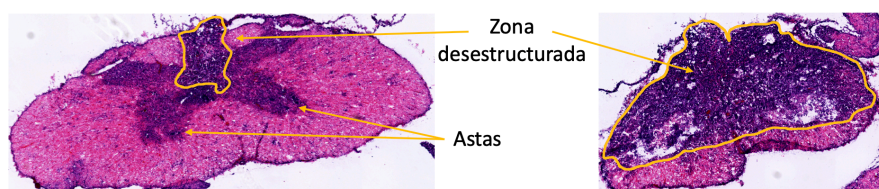


Figura 13. Área de tejido desestructurado. En la figura se observan dos cortes transversales en los que se señala el área desestructurada, así como las astas ventrales.

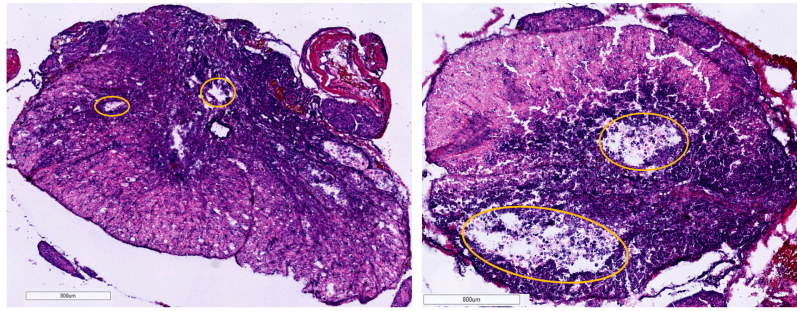


Figura 14. Identificación de quistes. En la figura se observan dos cortes transversales en los que se señalan algunos quistes.

3.2.5. Inmunohistoquímica

El protocolo común utilizado para inmunohistoquímica es el detallado a continuación. En primer lugar, se dejaron descongelar las lonchas previamente cortadas y colocadas sobre portaobjetos. Se lavaron las muestras con una solución de PBS a 4°C y se bloqueó con una solución permeabilizadora compuesta por Normal goat serum al 5% y tritón al 0,2% en PBS, dejándose actuar 60 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se retiró el líquido de bloqueo y se preparó el anticuerpo deseado en solución de anticuerpo, la cual consta de BSA 1% y tritón 0,2% en PBS. Se aplicó dicha solución sobre las muestras y se dejó incubar overnight a 4°C.

Al día siguiente, se lavaron las muestras varias veces con PBS frío y se preparó el anticuerpo secundario en solución de anticuerpo, dejándolo actuar una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizaron varios lavados con PBS frío de nuevo y se tiñeron los núcleos con DAPI, dilución 1:1000. Por último, se montaron los cubreobjetos de vidrio con líquido de montaje (Fluoromount, F4680, Southern Biotech). Los anticuerpos utilizados para el análisis histológico de las lonchas fueron los indicados en la Tabla 3.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica.

Anticuerpo primario	Dilución	Marcaje	Especie	Anticuerpo secundario	Dilución
GFP, ab6556, ABCAM	1:1000	epSPCs tratadas inyectadas	Chicken	Anti-Chicken 488	1:400

Tras la tinción, se escanearon los portaobjetos (Aperio VERSA Brightfield, Fluorescence & FISH Digital Pathology Scanner, Leica) y las imágenes se analizaron mediante el software ImageScope (Leica). El análisis de las lonchas consistió en la localización de las epSPCs inyectadas en la médula, las cuales son positivas para GFP. Una vez localizadas, se midió el área que ocupaban en cada loncha con el software Fiji y se calculó el área promedio cubierto por epSPCs en una loncha.

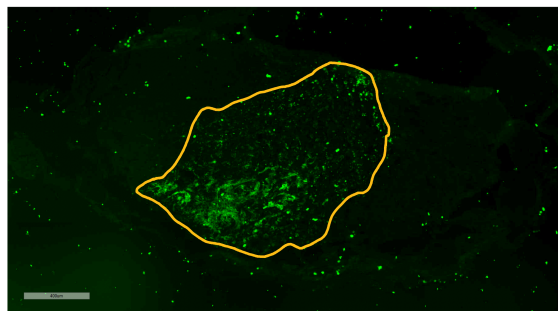


Figura 15. Área ocupada por las epSPCs trasplantadas (células GFP positivas). La imagen muestra un marcaje anti-GFP para visualizar las epSPCs inyectadas.

3.2.6. Western Blot

Además de los Western Blot a partir de células tratadas, se comenzó con el estudio de las rutas de señalización activas e inactivas en la LM a partir de homogeneizados de médulas procedentes de los animales tratados en el experimento *in vivo* descrito anteriormente. Una vez realizados los homogeneizados, es necesario estimar el contenido proteico de cada una de las muestras, previamente a la realización de un Western Blot. Para ello, se utilizó una placa de 96 pocillos y se siguió el protocolo especificado por el kit de cuantificación “Pierce BCA protein assay kit 23225” (Thermo Fisher). Este ensayo mide la absorbancia de la muestra al entrar en contacto con solución proporcionada en el kit. Por ello, para poder extrapolar los datos de absorbancia a datos de concentración de proteína, se utilizó como curva patrón una serie de diluciones de BSA (0 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,6 mg/ml, 1,25 mg/ml, 2,5mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml) de concentración conocida. La placa de 96 pocillos se incubó 30 minutos a 37°C en agitación y la absorbancia se leyó en un espectrofotómetro.

Para la determinación de las proteínas de interés en este trabajo se cargaron 30 µg de extractos de proteína con tampón de carga con DTT 1X (previamente desnaturalizados en el Thermomixer (Eppendorf) a 96°C) en geles de SDS-poliacrilamida (con un gel separador del 10%). Como marcador de pesos moleculares, se cargaron en el gel 6 µl del marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Se cargaron las muestras en los pocillos (30-40 µl) y se dejó correr la electroforesis a voltaje constante (100 V) aproximadamente 60-90 min. Tras la separación de las proteínas, éstas fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (ThermoFisher). La transferencia se realizó en hielo a amperaje constante (125 mA para un gel o 250 mA para dos geles) durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se tiñó la membrana con rojo Ponceau (P3504, Sigma), para comprobar que la transferencia había sido efectiva.

Una vez desteñida la membrana mediante repetidos lavados con TBST (Tris-Buffered Saline (TBS)-Tween 20 (TBST)), se bloquearon los sitios inespecíficos con solución de bloqueo (BSA/leche al 5% en TSB-Tween), durante una hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, la membrana fue incubada toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (Tabla 4) que se encuentra diluido en la misma solución de bloqueo. Al día siguiente, fueron realizados tres lavados con TBST 1X y se añadió el anticuerpo secundario (Tabla 4) en solución de bloqueo incubándolo durante una hora a temperatura ambiente. La membrana se reveló utilizando líquido de revelado (Pierce™ ECL Western, Blotting substrate, Thermo Scientific) en un sistema automático (Q9 Alliance) y la expresión relativa de las proteínas estudiadas se cuantificó mediante el software Image Studio Lite. Una vez revelada, se lavó la membrana y se aplicó la solución Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermofisher) durante 15 minutos para retirar el anticuerpo utilizado y poner así uno diferente, repitiendo el proceso descrito.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para Western Blot de muestras de homogeneizados de médula.

Anticuerpo primario	Dilución	Especie	Anticuerpo secundario	Dilución
pAMPK beta1 4181, Sampler kit 9957	1:1000	Rabbit	Donkey anti-Rabbit IgG-HRP Conjugated Santa Cruz Biotechnology sc-2313	1:2000
pAKT 92715, Cell Signalling	1:1000	Rabbit	Donkey anti-Rabbit IgG-HRP Conjugated Santa Cruz Biotechnology sc-2313	1:2000
TubulinaT6074, Sigma Aldrich	1:1000	Mouse	ECL ANTI-MOUSE IgG, Horseadish Peroxidase linked whole antibody (from sheep), NA931V, Amersham Biosciences	1:2000

3.2.7. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prisma 6. En primer lugar se analizó la normalidad de los datos mediante tres tests diferentes: "D'Agostino & Pearson omnibus normality test", "Shapiro-Wilk normality test" y "KS normality test". Este análisis indicó que nuestros datos no siguen una distribución normal, por lo que se utilizó tests no paramétricos. Todos los datos se han expresado como "Media \pm SEM". Las comparaciones entre los grupos de datos se realizaron mediante el test de Kruskal-Wallis y las comparaciones entre dos grupos mediante un test de Mann-Whitney. Se tomaron como valores estadísticamente significativos aquellos con un *P value* <0.05.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto del tratamiento con Fasudil y PGA-SS-Fasudil sobre la longitud de neuritas *in vitro*

Según Chen *et al.* (2015), la activación de la vía Rho/ROCK reduce la longitud de neuritas en cultivo, sin embargo, la adición de Fasudil al medio, recupera la prolongación de las neuritas y ayuda en la ramificación de éstas y la formación de conexiones sinápticas. En este primer ensayo se pretende estudiar si el incremento en la longitud de las prolongaciones celulares descrito para el Fasudil se implementa cuando las epSPCs son tratadas con el PGA-SS-Fasudil. Para ello, se utilizaron epSPCs de rata neonatal las cuales se cultivaron en adherencia sobre *coverslips* tratados con Matrigel y con medio de proliferación. El Fasudil libre y el PGA-SS-Fasudil se adicionaron al medio de cultivo en concentraciones no tóxicas (50 y 100 μM) para su comparación equimolar.

Por otro lado, se trataron dos cultivos con Rolipram a 0.5 y 10 μM . Esto se debe a que se ha descrito que la inhibición de la regeneración en las células neuronales adultas está relacionada con un descenso en los niveles de AMPc (adenosín monofosfato cíclico) y que el incremento de los niveles de AMPc en neuronas adultas es capaz de prevenir la inhibición del crecimiento (Cai *et al.*, 2001). Es por ello, que el aumento de los niveles de AMPc está siendo investigado como una posible diana para incrementar la regeneración axonal.

El AMPc es un mensajero secundario en la actividad trascricional de genes relacionados con la regulación del ciclo celular, mecanismos de respuesta celulares y la respuesta inmunitaria (Mauricio-Rueda, 2012). Sin embargo, tal y como afirma Pearse (2004), el mantenimiento de los niveles de AMPc también es clave para la protección, crecimiento y mielinización de los axones tras una LM, así como para la recuperación de la función motora. Tras la LM, se ha observado un descenso en los niveles de AMPc en la zona rostral de la médula espinal y el córtex motor sensorial. A partir de esta observación, surge una nueva línea de investigación, la cual busca activar la señalización mediada por AMPc como vía de estimulación neuronal frente a las señales inhibitorias del ambiente (Johansson, 2007). En favor de esta estrategia, se ha demostrado que el AMPc reduce la apoptosis y favorece la recuperación funcional tras una LM (Qi *et al.*, 2019).

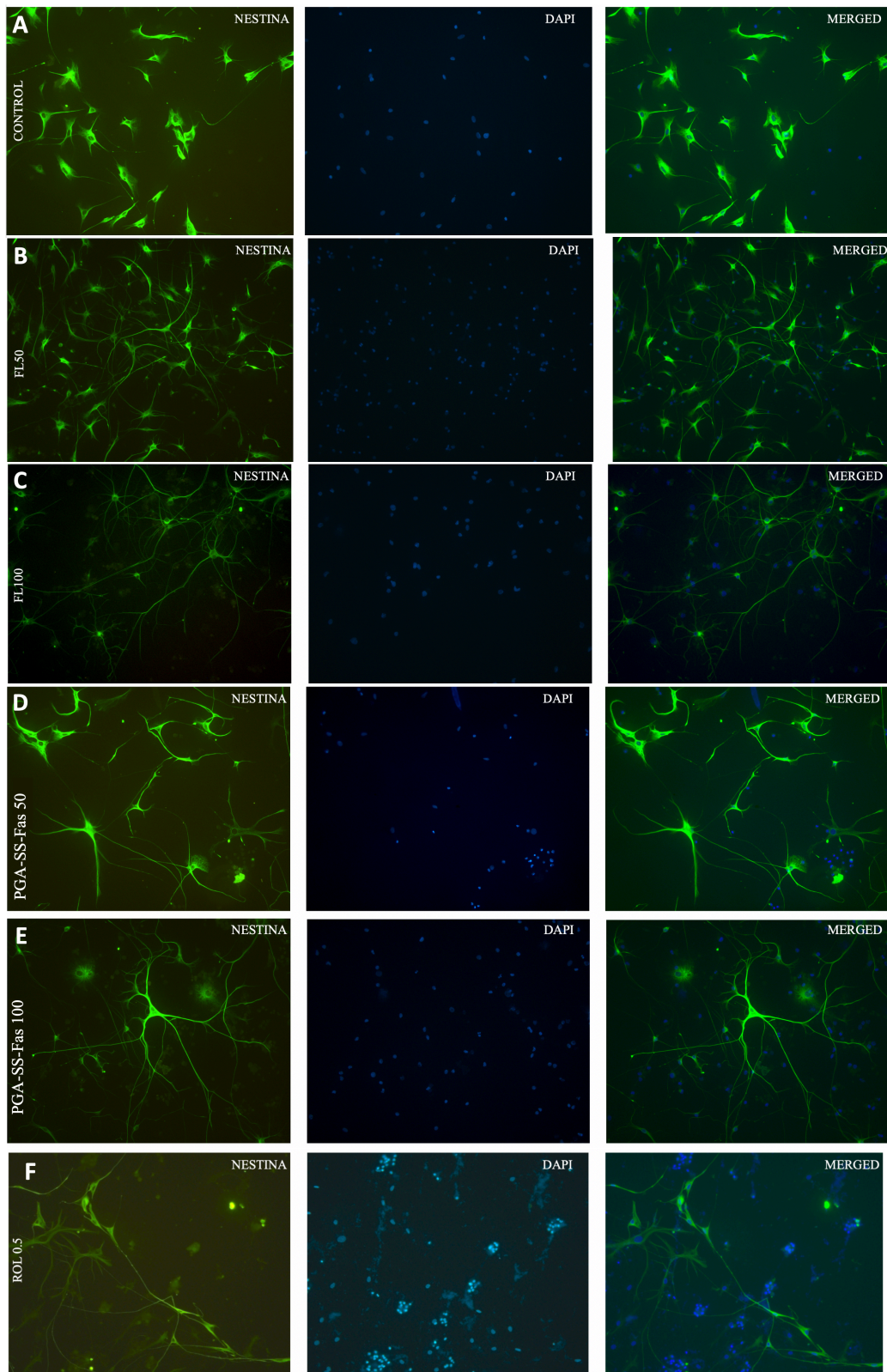
Estudios previos en nuestro laboratorio muestran una disminución de los niveles de AMPc tras la LM y su restablecimiento tras el tratamiento *in vivo* con PGA-SS-Fasudil (resultados en preparación para publicar). Por esta razón, se ha querido estudiar si los niveles de AMPc influyen en nuestro modelo *in vitro*. Una de las varias rutas que pueden inducir una acumulación del AMPc es la inhibición de la fosfodiesterasa-4 (PDE-4). En este experimento hemos utilizado el Rolipram como inhibidor de la PDE-4, con el fin de aumentar el nivel de AMPc endógeno y estudiar si este hecho tiene un efecto sobre las prolongaciones de las epSPCs superior al observado para el PGA-SS-Fasudil.

Con el fin de observar con claridad las prolongaciones celulares, a las 24 horas se fijaron las células y se tiñeron mediante inmunocitoquímica con Nestina, el cual es un marcador temprano de progenitores neurales destinados a diferenciarse en neuronas. En la figura 16 se muestran imágenes representativas para cada uno de los tratamientos, en las que a simple vista, es posible observar como las prolongaciones celulares alcanzan una mayor longitud cuando el cultivo ha sido tratado, ya sea con Fasudil libre, con PGA-SS-Fasudil o con Rolipram, que las prolongaciones del cultivo control.

Los resultados que aparecen representados en la Figura 17 corresponden a la media de la longitud de neurita de todas las células medidas para cada uno de los tratamientos. Dichos valores nos indican que la longitud media alcanzada por las prolongaciones de las epSPCs tratadas con Fasudil libre o PGA-SS-Fasudil, es estadísticamente significativa con respecto a la longitud alcanzada por las células del grupo control, dato que sugiere que la inhibición de ROCK mediada por el Fasudil, ejerce un efecto sobre la longitud de neuritas en cultivos *in vitro*, tal y como afirma Lingor *et al.* (2007). Sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento con Fasudil libre y con PGA-SS-Fasudil.

Los resultados de las mediciones para los tratamientos con Rolipram 0.5 μM y 1 μM , presentan una significancia estadística respecto del control, la cual nos indica que el aumento de AMPc podría estar

relacionado con un mayor desarrollo de las prolongaciones. Lau *et al.* (2013) afirman que la aplicación de AMPc tras una LM promueve la regeneración axonal, evitando patrones de crecimiento anormales e incrementando la supervivencia de las neuronas. Además, se ha visto que la inhibición de la hidrólisis de AMPc es capaz de promover la protección de los axones y su mielinización (Pearse *et al.*, 2004), característica relevante en la búsqueda de un compuesto efectivo para el tratamiento de la LM.



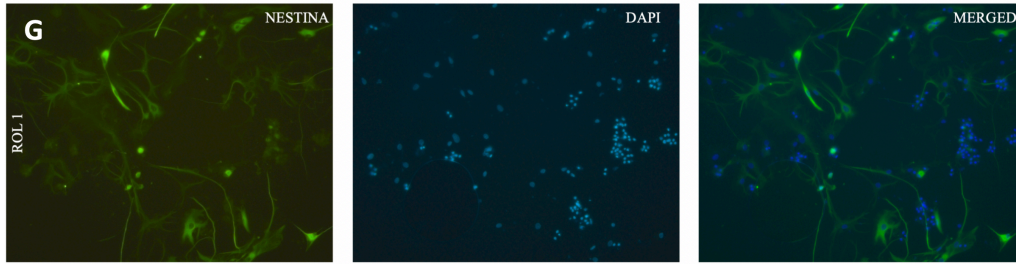


Figura 16. Inmunocitoquímica de epSPCs para cada tratamiento. La nomenclatura de los tratamientos aplicados se corresponde con: A)Control, B)FL50=Fasudil libre 50 μ M, C)FL100= Fasudil libre 100 μ M, D)PGA-SS-Fas 50=Fasudil conjugado a PGA 50 μ M, E)PGA-SS-Fas 100= Fasudil conjugado a PGA 100 μ M, F)ROL 0.5=Rolipram 0.5 μ M, G)ROL 1=Rolipram 1 μ M. Los tratamientos se aplicaron en el medio de cultivo (medio de proliferación) a concentraciones no tóxicas y las células se fijaron 24 horas después. Las imágenes de la izquierda muestran la tinción con Nestina, las imágenes centrales la tinción de los núcleos con Dapi y las de las izquierda ambas imágenes solapadas (“merged”).

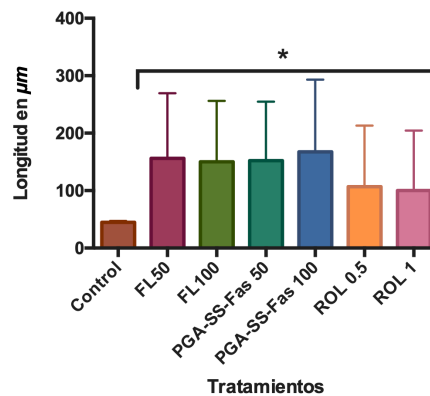


Figura 17. Efecto del Fasudil libre, Fasudil conjugado a PGA y Rolipram sobre la longitud de las prolongaciones de epSPCs *in vitro*. La nomenclatura de los tratamientos aplicados se corresponde con: FL50=Fasudil libre 50 μ M, FL100= Fasudil libre 100 μ M, PGA-SS-Fas 50=Fasudil conjugado a PGA 50 μ M, PGA-SS-Fas 100= Fasudil conjugado a PGA 100 μ M, ROL 0.5=Rolipram 0.5 μ M, ROL 1=Rolipram 1 μ M. Los tratamientos se aplicaron en el medio de cultivo (medio de proliferación) a concentraciones no tóxicas y las células se fijaron 24 horas después. ($n=2$) Los datos se han representado como media \pm SEM. El símbolo * indica que los valores representados para cada uno de los tratamientos son estadísticamente significativos con respecto al valor control (P value <0.0001).

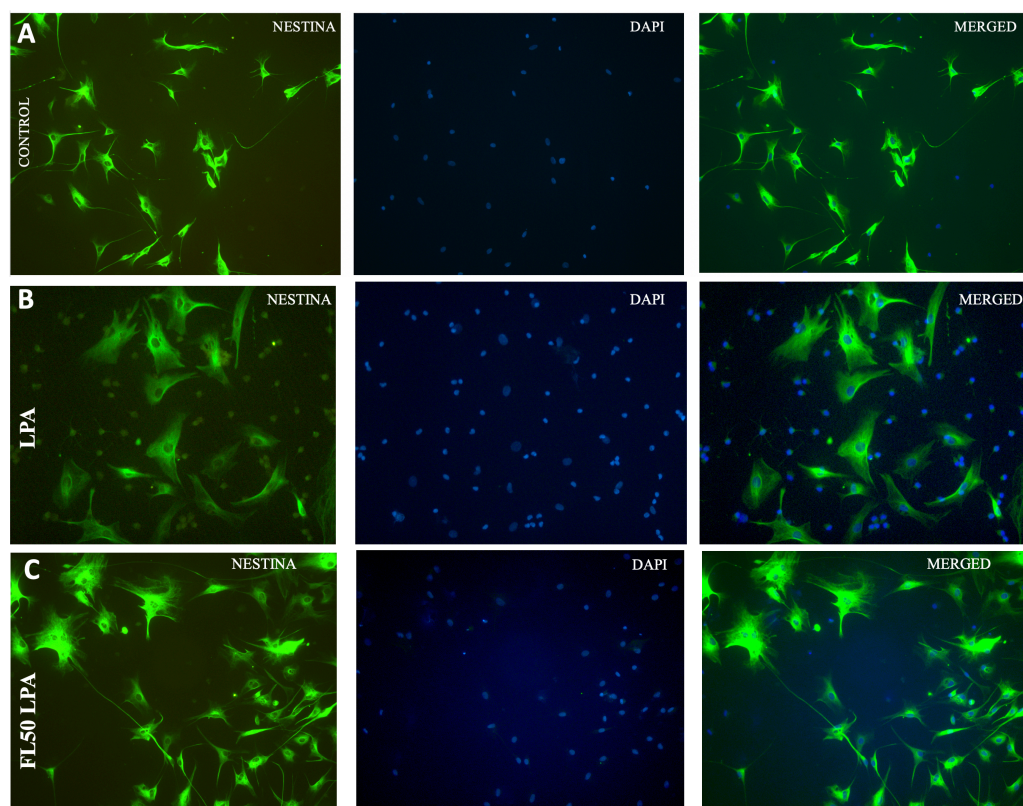
4.2. Efecto del tratamiento con Fasudil sobre la longitud de neuritas en epSPCs en un modelo *in vitro* de LM

El ambiente en la LM es muy complejo y muy diferente al encontrado *in vitro*. Por esta razón, a pesar de haber observado que el Fasudil, el PGA-SS-Fasudil y el Rolipram presentan un efecto sobre la prolongación de los axones, no tenemos la certeza de que ese hecho se dé con la misma eficacia en el ambiente inhibitorio creado debido a una LM. Es por ello que el mismo experimento descrito en el apartado anterior se reprodujo añadiendo LPA al medio de todos los cultivos tratados (a excepción del control). Como se ha explicado anteriormente, el LPA estimula la cascada de señalización Rho/ROCK, induciendo el colapso del cono de crecimiento y la retracción de las neuritas. De esta manera, la adición de LPA al medio ofrece un modelo de LM *in vitro* sobre el cual es posible testar la eficacia del Fasudil libre y del Fasudil conjugado con mayor precisión.

En la figura 18 se pueden observar las epSPCs tratadas con LPA a una concentración de 10 μM y en presencia o ausencia de Fasudil libre 50 o 100 μM y PGA-SS-Fasudil 50 o 100 μM , las cuales se han marcado con Nestina y Dapi. Los resultados mostraron que el LPA efectivamente induce la retracción de neuritas en aproximadamente un 50% (Figura 18 B y figura 19), dando como resultado células más redondeadas, debido a la reorganización de los microtúbulos del citoesqueleto de actina (Sayas *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha descrito un aumento en la actividad de GSK3 tras el colapso del cono de crecimiento por acción del LPA, el cual puede suponer una relación entre la dinámica de los microtúbulos y los microfilamentos de actina durante la neuritogénesis (Sayas *et al.*, 1999). Por esta razón, futuros estudios del efecto del LPA sobre las neuritas podrían enfocarse en el papel de GSK3 en este proceso.

Con respecto a los tratamientos aplicados, nuestros resultados indican que tanto el Fasudil libre como el PGA-SS-Fasudil, como el Rolipram, podrían tener la suficiente capacidad promotora del crecimiento axonal como para sobrepasar el efecto del LPA sobre las células y aun así incrementar la longitud de las prolongaciones (Figura 19). Sin embargo, debemos tener en cuenta ciertas matizaciones. El objetivo principal de este trabajo es estudiar si el conjugado de Fasudil propuesto mejora los efectos del Fasudil libre. Por esta razón, es relevante destacar que, a pesar de que el FL50 incrementa la longitud de prolongación en nuestro modelo *in vitro* de LM de manera estadísticamente significativa, el PGA-SS-Fasudil muestra unos resultados mucho más prometedores en cuanto a mayor longitud de prolongación se refiere.

En relación al tratamiento con Rolipram, los resultados indican un incremento estadísticamente significativo frente al LPA para ambas concentraciones utilizadas (0.5 y 1 μM) (Figura 18 G y H y figura 19). Estos resultados están de acuerdo con lo expuesto en la literatura, ya que se ha visto que el Rolipram es capaz de mantener los niveles de AMPc tras la LM (Pearse *et al.*, 2004), por lo que cabría esperar que se produjera un incremento en la longitud de neuronas del mismo modo que ocurre si no adicionamos LPA al medio.



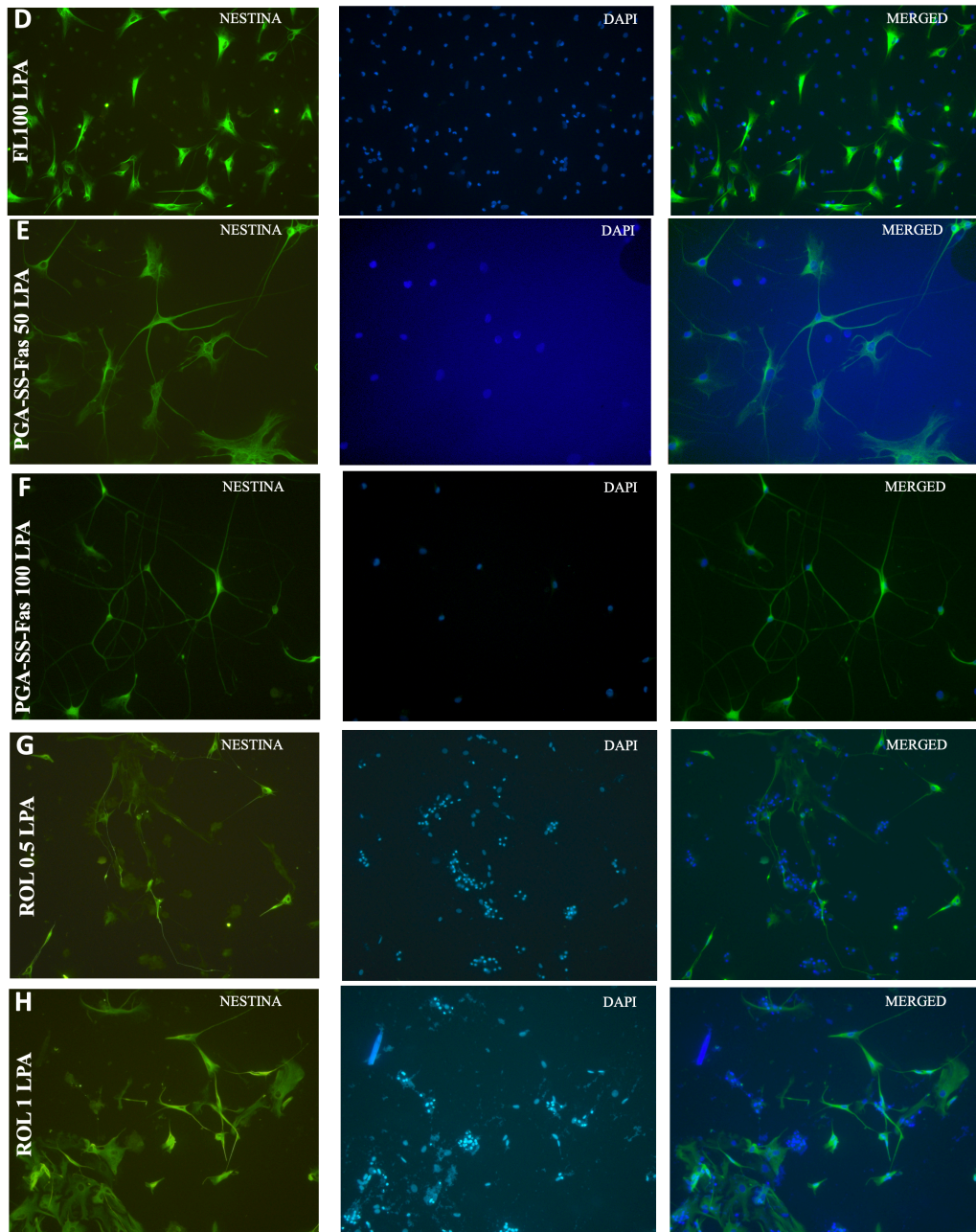


Figura 18. *Inmunocitoquímica de epSPCs para cada tratamiento en un modelo de LM in vitro. La nomenclatura de los tratamientos aplicados se corresponde con: A)Control, B)LPA=LPA 10 μ M añadido al medio de cultivo, C)FL50 LPA=Fasudil libre 50 μ M con LPA 10 μ M, D)FL100 LPA=Fasudil libre 100 μ M con LPA 10 μ M, E)PGA-SS-Fas 50 LPA=Fasudil conjugado a PGA 50 μ M con LPA 10 μ M, F)PGA-SS-Fas 100 LPA= Fasudil conjugado a PGA 100 μ M con LPA 10 μ M, G)ROL 0.5 LPA=Rolipram 0.5 μ M con LPA 10 μ M, H)ROL 1 LPA=Rolipram 1 μ M con LPA 10 μ M. Los tratamientos se aplicaron en el medio de cultivo (medio de proliferación) a concentraciones no tóxicas y el LPA se adicionó 24 después. Las células se fijaron al día siguiente. Las imágenes de la izquierda muestran la tinción con Nestina, las imágenes centrales la tinción de los núcleos con Dapi y las de la izquierda ambas imágenes solapadas (“merged”).*

Con respecto a los tratamientos con Fasudil, se realizaron dos repeticiones del experimento (n=2). En la figura 19 B, se encuentra representado el porcentaje de cambio para cada tratamiento respecto del control para las dos repeticiones del experimento. En esta gráfica se puede observar que dicho porcentaje es mayor para los datos correspondientes a la primera de las repeticiones, lo que podría

indicar que el segundo experimento no ha funcionado correctamente. Para corroborar los datos del primer experimento sería conveniente realizar al menos una repetición más (n=3).

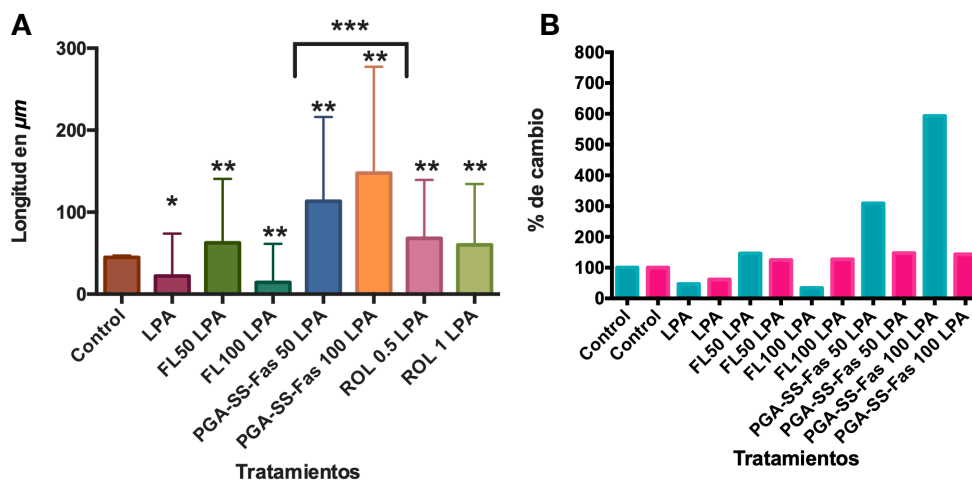


Figura 19. Efecto del Fasudil libre, Fasudil conjugado a PGA y Rolipram sobre la longitud de las prolongaciones de epSPCs en un modelo in vitro de LM. A) Longitud de las neuritas para cada tratamiento. B) Porcentaje de cambio frente al control para cada tratamiento en las dos repeticiones del experimento. Nomenclatura: LPA=LPA 10 µM añadido al medio de cultivo, FL50 LPA=Fasudil libre 50 µM con LPA 10 µM, FL100 LPA= Fasudil libre 100 µM con LPA 10 µM, PGA-SS-Fas 50 LPA=Fasudil conjugado a PGA 50 µM con LPA 10 µM, PGA-SS-Fas 100 LPA= Fasudil conjugado a PGA 100 µM con LPA 10 µM, ROL 0.5 LPA=Rolipram 0.5 µM con LPA 10 µM, ROL 1 LPA=Rolipram 1 µM con LPA 10 µM. (n=2) Los datos se han representado como media ± SEM. El símbolo * indica que el valor medio para LPA es estadísticamente significativo con respecto al valor control (P value <0.0001), ** indica que los valores representados para cada uno de los tratamientos son estadísticamente significativos con respecto al LPA (P value <0.0001) y *** indica que SS50 LPA y SS100 LPA son estadísticamente significativos respecto a FL50 LPA y FL100 LPA (P value <0.0001).

Con el fin de completar este estudio, se podrían estudiar diversas rutas de señalización, entre las cuales resultaría de interés la señalización mediada por AMPc. Una de las rutas por las que el AMPc ejerce un efecto sobre el crecimiento axonal es la activación de PKA. La fosfoquinasa A (PKA) es una diana “downstream” del AMPc, la cual ha sido asociada al crecimiento axonal. De este modo, se pensaba que la inhibición de PKA resultaría en una reducción de la recuperación funcional. Sin embargo, Wei et al. (2016) observaron que la recuperación resultaba mejorada tras la inhibición de PKA. Fue entonces cuando se propuso la existencia de otro mecanismo dependiente de AMPc que estuviera implicado en la recuperación funcional tras una LM.

Dicho mecanismo fue el mediado por EPAC (Exchange Protein Activated by cAMP) (Wei et al., 2016). EPAC es un efector secundario de AMPc que presenta dos isoformas, EPAC-1 y EPAC-2, siendo la segunda expresada en el tejido neural (Peace and Shewan, 2011). Wei et al. (2016), demostraron que la inhibición de EPAC-2 y PKA conlleva una reducción del crecimiento de las neuritas significativo. De esta forma, se propuso que tras la inhibición de PKA, queda disponible más AMPc para promover plasticidad a través de la vía de EPAC-2. El próximo paso en el desarrollo de este estudio sería, pues, el análisis de los niveles de AMPc, pPKA, PKA, EPAC-1 y EPAC-2 mediante Western blot.

4.3. El Fasudil afecta a la diferenciación de epSPCs en un modelo de LM in vitro

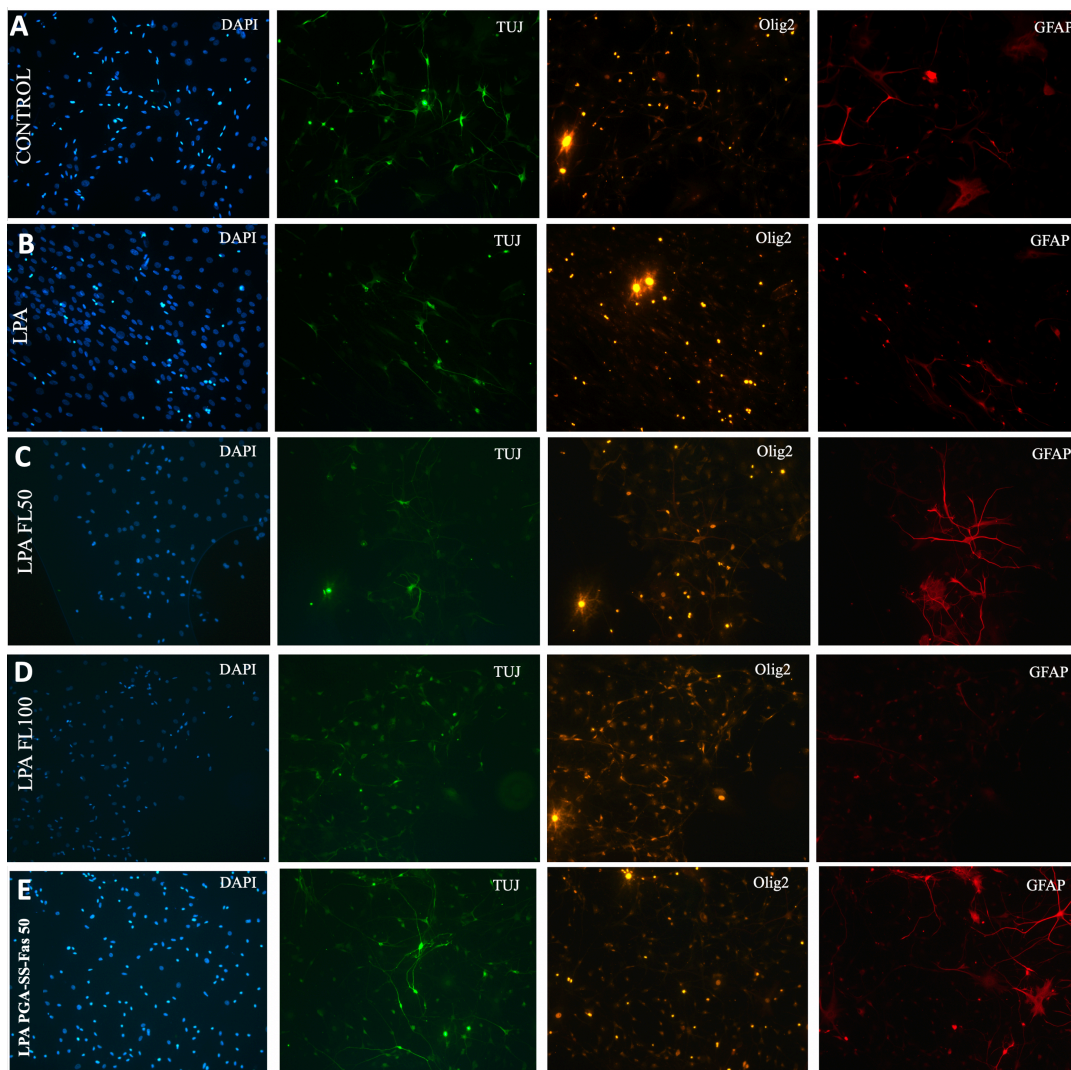
A pesar de que la proliferación de las epSPCs en los mamíferos es frecuente durante el desarrollo embrionario y el período postnatal, el recambio de éstas decae significativamente durante el desarrollo del individuo (Bruni, 1998). Sin embargo, se ha descrito que la inflamación inducida a causa de la LM contribuye a la activación de las epSPCs endógenas e induce la proliferación y diferenciación celular

(Mikami *et al.*, 2004), hecho que sugiere la explotación del potencial de las epSPCs en la reparación de la LM.

Una de las líneas de investigación en esta dirección es el trasplante de epSPCs. No obstante, el trasplante de células progenitoras sin diferenciar resulta en un fallo de la consiguiente diferenciación *in vivo* o en una diferenciación en la que el linaje astrocítico es predominante, hecho que contribuye a la formación de la cicatriz glial (Ricci-Vitiani *et al.*, 2006). Parr *et al.* (2007) han descrito que las epSPCs sin diferenciar presentan potencial regenerativo únicamente cuando son trasplantadas una semana después de la lesión. Es por ello, que uno de los objetivos de la terapia celular para tratar la LM es la restricción de la diferenciación de las células trasplantadas a oligodendrocitos o motoneuronas que sean capaces de sustituir las células dañadas.

Las células epSPC precondicionadas son una parte fundamental del tratamiento para la LM propuesto en este laboratorio. Es por ello, que conocer su futura diferenciación una vez inyectadas en la médula es prioritario en nuestro estudio. Más concretamente, en este análisis estudiamos si el PGA-SS-Fasudil promueve la diferenciación espontánea de los progenitores neurales en un modelo de LM *in vitro*.

El modelo de LM se indujo mediante la adición de LPA al medio de diferenciación 24 horas tras los tratamientos. Las células se fijaron 24 horas de la adición del LPA y la identificación de los linajes celulares en los que derivaron las células se realizó en base a la expresión de Tuj (BIII-tubulina), Olig-2 (Oligodendrocyte Transcription Factor 2) y GFAP (Glial Fibrillary acidic protein), siendo éstos marcadores de neuronas, oligodendrocitos y astrocitos, respectivamente (Figura 20).



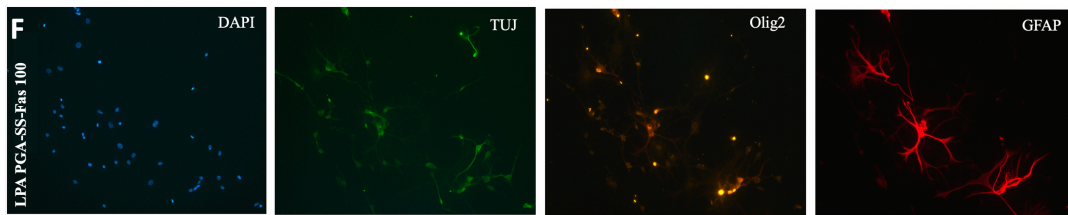


Figura 20. Inmunocitoquímica de epSPCs precondicionadas y diferenciadas espontáneamente. La nomenclatura de los tratamientos aplicados se corresponde con: A) Control, B) LPA=LPA 10 μ M añadido al medio de cultivo, C) LPA FL50=Fasudil libre 50 μ M con LPA 10 μ M, D) LPA FL100=Fasudil libre 100 μ M con LPA 10 μ M, E) LPA PGA-SS-Fas 50=Fasudil conjugado a PGA 50 μ M con LPA 10 μ M, F) LPA PGA-SS-Fas 100= Fasudil conjugado a PGA 100 μ M con LPA 10 μ M. Los tratamientos se aplicaron en el medio de cultivo (medio de proliferación) a concentraciones no tóxicas y el LPA se adicionó 24 después. Las células se fijaron al día siguiente.

En la figura 21 (A, B y C) encontramos la representación del porcentaje de células positivas para cada uno de los marcajes mencionados. En la figura 21 A encontramos el porcentaje de células positivas para Tuj, marcador de neuronas. Estos resultados muestran una aparente reducción (no significativa) en el porcentaje de neuronas para la adición de LPA al medio y unos niveles similares para el tratamiento con Fasudil libre 50 μ M (no significativo). Sin embargo, observamos que el Fasudil libre a elevada concentración (100 μ M) y el PGA-SS-Fasudil en ambas concentraciones testadas (50 y 100 μ M), parecen incrementar el número de epSCPs que se diferencian hacia neuronas de manera estadísticamente significativa. Este hecho podría resultar en una mejor recuperación funcional por sustitución de las neuronas dañadas, ya que se trata del tipo celular más afectado tras la lesión.

Por otro lado, se calculó el porcentaje de células positivas para el marcaje con Olig2 (Figura 21 B), marcador de oligodendrocitos. El papel principal de los oligodendrocitos es la formación de las envolturas de mielina que recubren los axones en el SNC (Plemel *et al.*, 2014). Nuestros resultados indican que tras la aplicación del LPA al medio de cultivo, el porcentaje de células Olig2 positivas parece verse reducido frente al control, aunque no sea de manera estadísticamente significativa. Este dato se correlaciona con la literatura, en la cual se describe que estas células son particularmente sensibles a la LM (Ahuja and Fehlings, 2016).

Con respecto a los tratamientos, el Fasudil libre 50 μ M parece que presenta un menor número de células Olig2 positivas, lo que significaría un menor porcentaje de epSCPs que se diferencian a oligodendrocitos, mientras que el Fasudil libre 100 μ M y el PGA-SS-Fasudil mantendrían el porcentaje de oligodendrocitos a niveles similares a los del LPA. No obstante estos datos no son estadísticamente significativos, por lo que no podemos afirmar que existan diferencias entre ellos. Sin embargo, sí que observamos una reducción estadísticamente significativa en el porcentaje de células Olig2 positivas para el tratamiento con PGA-SS-Fasudil. Debido a que los oligodendrocitos son las células encargadas de mielinizar los axones, una menor diferenciación hacia este tipo celular podría dificultar la remielinización de los axones dañados, retrasando la recuperación. Además, se ha visto que la activación de ROCK frena la diferenciación de los precursores de oligodendrocitos (Koch *et al.*, 2018)), por lo que cabría esperar que el PGA-SS-Fasudil, como inhibidor de ROCK, fuera capaz de contrarrestar este efecto e inducir la diferenciación hacia este linaje. Es por ello, que es necesario repetir este estudio ampliando la n para corroborar los resultados obtenidos, ya que únicamente se realizó una n=1.

Por último, se estudió la diferenciación espontánea a astrocitos mediante el marcaje con GFAP (Figura 21 C). Los astrocitos son las células más abundantes en el sistema nervioso central y desarrollan funciones tales como la distribución de la energía, el mantenimiento de la homeostasis, aportar soporte metabólico a las neuronas y controlar su desarrollo (Koch *et al.*, 2018). En este caso nuestros resultados no son estadísticamente significativos, por lo que no podemos afirmar que los tratamientos ejerzan un efecto sobre el número de epSCPs que se diferencian a astrocitos. Sin embargo, parece observarse una tendencia a incrementar este porcentaje para los tratamientos con Fasudil libre 50 y 100 μ M y PGA-SS-Fasudil 50 μ M, mientras que parece verse reducido para el PGA-SS-Fasudil 100 μ M. Debido a que los astrocitos son las principales células formadoras de la cicatriz glial (Tran *et al.*,

2018), el hecho de que el PGA-SS-Fasudil fuera capaz de reducir la diferenciación de las epSPCs a astrocitos podría significar una mayor dificultad para formar la cicatriz glial, lo cual podría ayudar en la regeneración de los axones. No obstante, la $n=1$, por lo que es preciso realizar más repeticiones de este ensayo para confirmar los resultados.

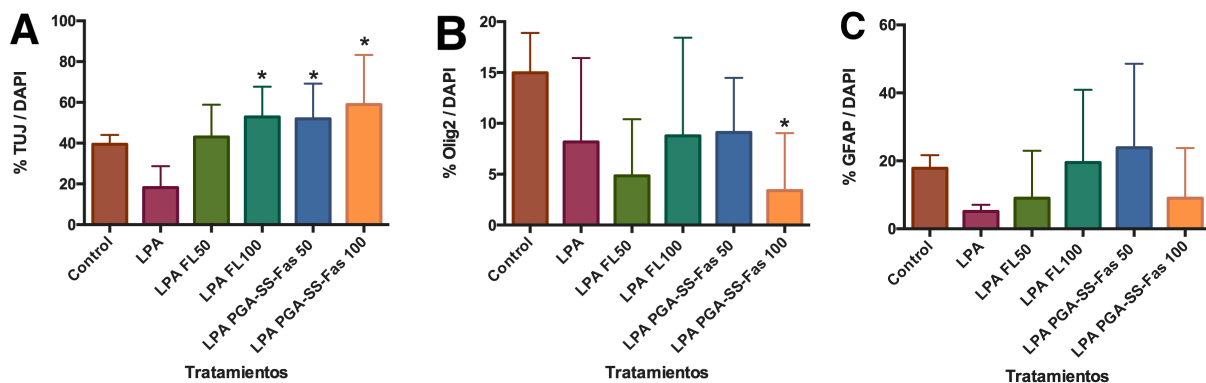


Figura 21. Porcentaje de células positivas para cada uno de los marcajes utilizados (A) Tuj1, B) Olig2 y C) GFAP). ($n=1$) Los datos se han representado como media \pm SEM. El símbolo * indica que los datos son estadísticamente significativos con respecto al LPA (P value < 0.0001). Nomenclatura: LPA=se añadió LPA 10 μ M al medio, LPA FL50=Fasudil libre 50 μ M con LPA 10 μ M, LPA FL100=Fasudil libre 100 μ M con LPA 10 μ M, LPA PGA-SS-Fas50=Fasudil conjugado 50 μ M con LPA 10 μ M, LPA PGA-SS-Fas100=Fasudil conjugado 100 μ M con LPA 10 μ M.

4.4. Efecto del trasplante de epSPCs preconicionadas con Fasudil libre y PGA-SS-Fasudil sobre el número de motoneuronas y área de expansión de la lesión en un modelo de LM *in vivo*

Como se ha explicado con anterioridad, la LM conlleva en la mayoría de los casos una pérdida de la capacidad motora y sensorial. Esto se debe a que el impacto físico causa la ruptura y degeneración de los axones presentes en el sitio de lesión (Muradov *et al.* 2013), así como el desencadenamiento de un proceso de necrosis y de apoptosis, por el cual el tejido sufre una desestructuración que se expande más allá del foco de lesión. (Tran *et al.*, 2018)

En este apartado, se ha estudiado si el preconicionamiento de epSPCs con Fasudil libre o con PGA-SS-Fasudil previo al trasplante de las células en un modelo de LM *in vivo* ejerce un efecto sobre el número de motoneuronas preservadas tras la lesión. Una vez localizadas las motoneuronas, siguiendo criterios morfológicos y de tamaño, se procedió a su contaje. Los resultados de la cuantificación mostrados en la figura 22, indican que el número de neuronas motoras se ve reducido en los animales a los que se trasplantaron células preconicionadas con Fasudil conjugado con respecto al tratamiento con Fasudil libre. No obstante, el número de motoneuronas preservadas para ambos tratamientos no es estadísticamente significativo respecto del control de epSPCs sin preconicionar, por lo que no podemos afirmar que el preconicionamiento tanto con Fasudil libre como con el conjugado presente un efecto sobre la preservación de las motoneuronas.

Además, se midió el área de tejido que ha sufrido degeneración para estudiar si los tratamientos aplicados a las células presentan un efecto sobre la expansión de la lesión. En la figura 23 se pueden ver diferentes cortes transversales en los que se señala la localización de las motoneuronas, así como la expansión de la lesión. Como ya se ha explicado, se ha considerado área desestructurada aquella en la que se ha perdido la definición de las astas conformadas por la materia gris.

En la figura 24, podemos ver los resultados de la medida del área que ocupa el tejido degenerado en una loncha transversal. El preconicionamiento de las epSPCs resulta en una expansión de la desestructuración mayor que para las epSPCs sin tratar, siendo el tratamiento con PGA-SS-Fasudil el que alcanza una mayor área degenerada.

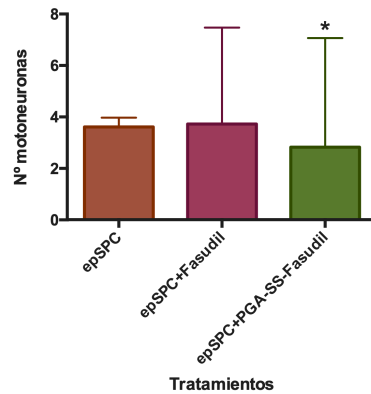


Figura 22. Número medio de motoneuronas presentes en una loncha de tejido de médula. Nomenclatura de los tratamientos: epSPCs= únicamente células ($n=2$), epSPC+Fasudil= células precondicionadas con Fasudil libre ($n=3$), epSPC+PGA-SS-Fasudil= células precondicionadas con Fasudil conjugado ($n=3$). Los datos se han representado como media \pm SEM. * Estadísticamente significativo (P value <0.0001) frente al tratamiento epSPC+Fasudil.

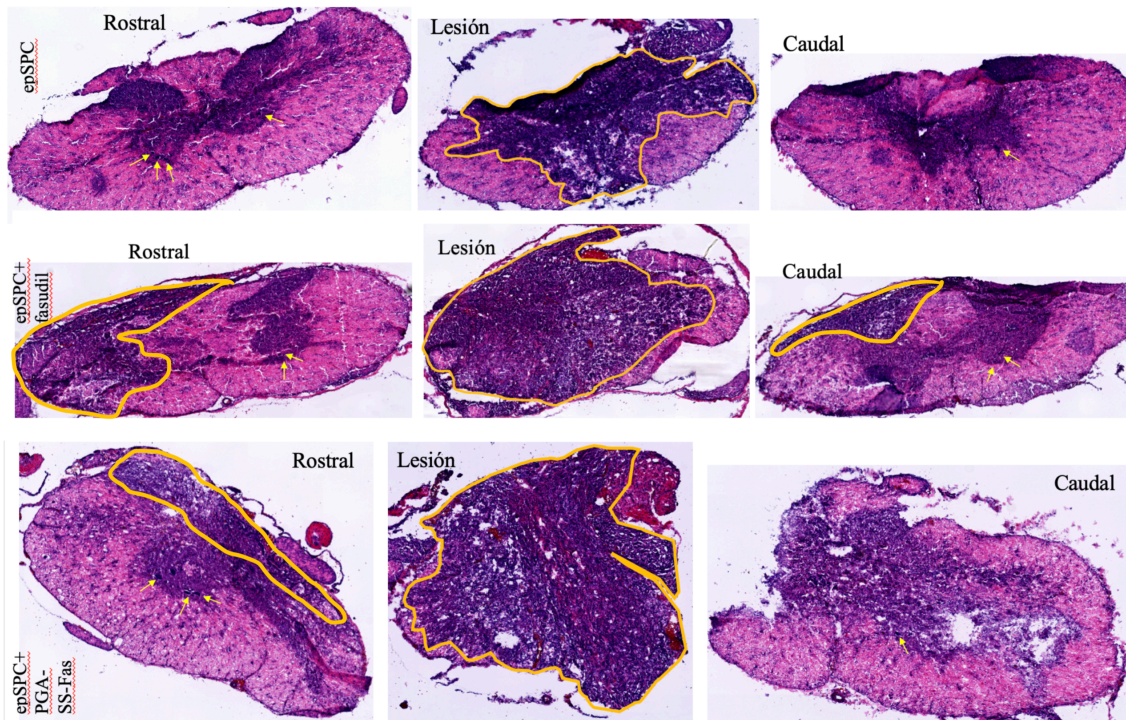


Figura 23. Cortes transversales de médula teñidos con HE correspondientes al epicentro de la lesión y las zonas adyacentes a éste (rostral y caudal). La nomenclatura corresponde a: A) epSPCs=células sin precondicionar ($n=2$), B) epSPC+Fasudil=células precondicionadas con Fasudil libre ($n=3$), epSPC+PGA-SS-Fasudil= células precondicionadas con Fasudil conjugado ($n=3$). Las flechas señalan la localización de las motoneuronas, mientras que en las imágenes centrales se encuentra rodeada el área desestructurada.

Este dato resulta desconcertante, ya que en este estudio se realizaron diferentes pruebas locomotoras a los animales durante las semanas de recuperación y los resultados mostraron que los animales del grupo trasplantado con células precondicionadas con PGAS-SS-Fasudil mostraban mejor pisada que el resto de los animales. Sin embargo, tal y como exponen Fehlings y Tator (1995), la función neurológica puede mantenerse con la supervivencia de únicamente el 10% de los axones. Por esta razón, se pensó que quizás la medida de la desestructuración del tejido no fuera la más acertada, ya que la aportación a la recuperación por parte del Fasudil conjugado parece estar enfocada a la protección axonal.

De este modo sería conveniente un estudio de las fibras de tubulina mediante inmunohistoquímica que corroborase si a pesar de observarse una desestructuración mayor del tejido, las fibras de tubulina se conservan mejor con el acondicionamiento con PGA-SS-Fasudil, lo que supondría mejores rendimientos en los test funcionales.

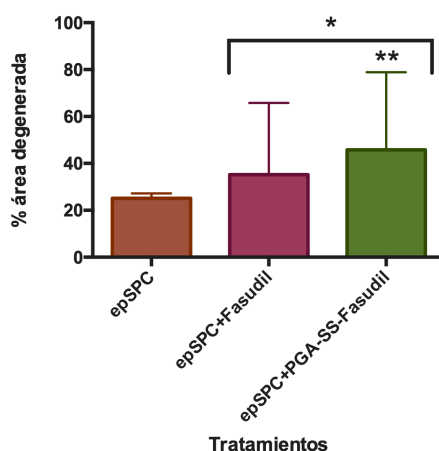
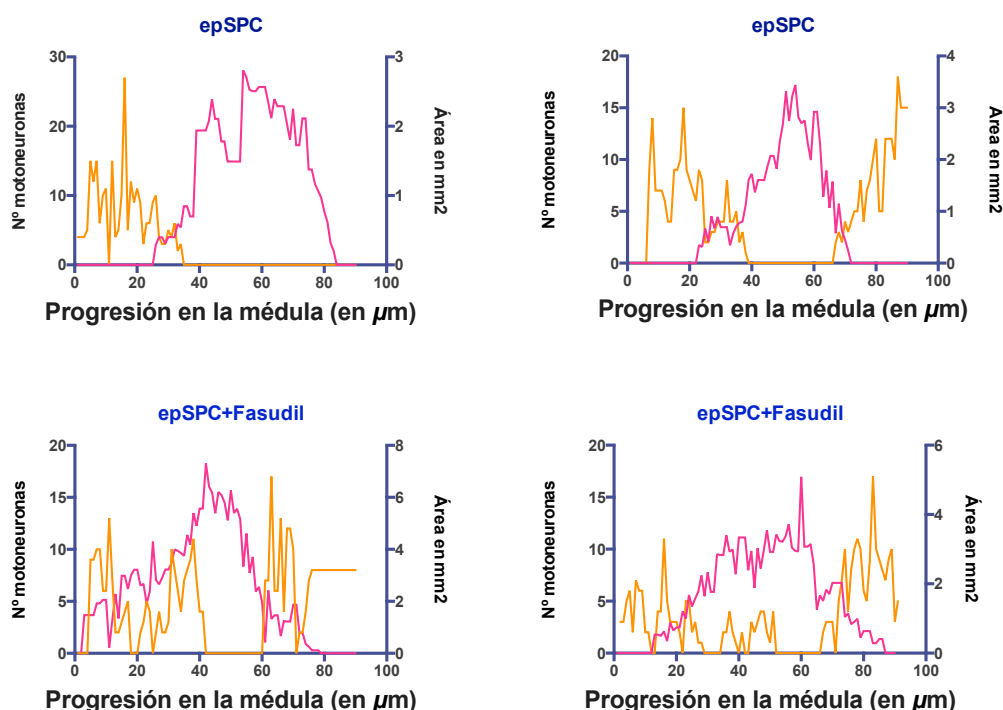


Figura 24. Porcentaje de área ocupada por tejido degenerado normalizada respecto al área total de cada loncha. Nomenclatura de los tratamientos: epSPCs= únicamente células (n=2), epSPC+Fasudil= células precondicionadas con Fasudil libre (n=3), epSPC+PGA-SS-Fasudil= células precondicionadas con Fasudil conjugado (n=3). Los datos se han representado como media ± SEM. Estadísticamente significativo (P value <0.0001): * frente al tratamiento con epSPCs, ** frente al tratamiento epSPC+Fasudil.

No obstante, a pesar de que los datos obtenidos son estadísticamente significativos, debemos tener en cuenta la complejidad de la lesión y la enorme variabilidad entre individuos sometidos al mismo tratamiento, así como el reducido número de animales utilizados en este análisis (epSPCs n=2, epSPC+Fasudil n=3, epSPC+PGA-SS-Fasudil n=3).

Por otro lado, se representaron los datos obtenidos para ambas variables estudiadas, número de motoneuronas y área desestructurada, de manera conjunta (Figura 25). En estas gráficas se puede ver cómo el número de motoneuronas, representado en el eje izquierdo, desciende, cuando el área desestructurada, en el eje derecho, se incrementa. Además, podemos observar la expansión de la desestructuración de manera longitudinal en los 4 mm de médula estudiada.



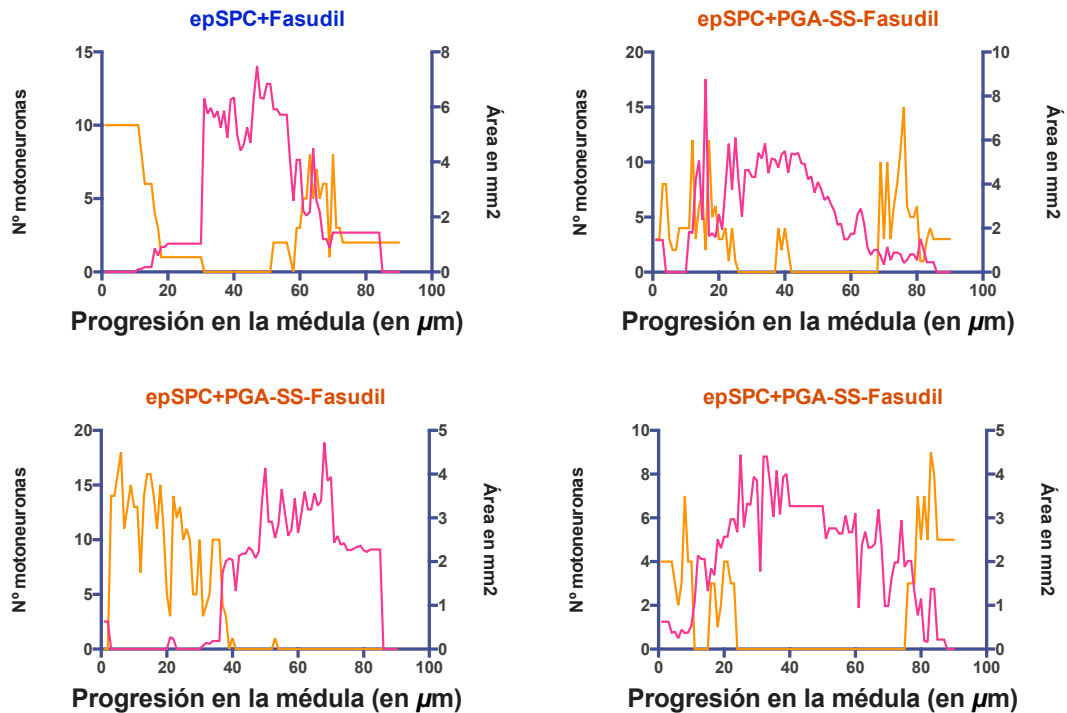


Figura 25. Número de motoneuronas y área de tejido degenerado en mm² a lo largo de los 4 mm de médula analizados. La línea naranja hace referencia al número de motoneuronas, representadas en el eje izquierdo, mientras que la línea rosa se refiere al área de tejido degenerado, representada en el eje derecho. Los grupos representados corresponden a los tratamientos aplicados a las células, previamente a su trasplante: epSPCs=únicamente células (n=2), epSPC+Fasudil=células precondicionadas con Fasudil libre (n=3), epSPC+PGA-SS-Fasudil=células precondicionadas con Fasudil conjugado (n=3). El eje de las X representa en porcentaje la longitud de los 4 mm de médula analizados, siendo 0 el inicio de la zona rostral y 100 el final de la zona caudal al epicentro de la lesión.

Este dato indica que para las epSPCs la desestructuración alcanza un 60% de la longitud de la médula analizada, para el precondicionamiento con Fasudil libre alcanza un 80% y para el Fasudil conjugado el 90%. Sin embargo, en esta figura se también se puede observar que en el trasplante de epSPCs sin precondicionar las líneas graficadas apenas se solapan, pero en el precondicionamiento con Fasudil libre y con el conjugado las líneas se solapan, sugiriendo que, como se ha mencionado anteriormente, a pesar de que la desestructuración se expande en mayor medida, se preserva una cantidad similar de motoneuronas en los tres grupos.

4.5. Efecto del trasplante de epSPCs precondicionadas con Fasudil libre y PGA-SS-Fasudil sobre los quistes en un modelo de LM *in vivo*

Los quistes son espacios llenos de líquido que surgen tras una lesión que obstruye el flujo de líquido cefaloraquídeo (Rubin, 2016). La ausencia de quistes de gran tamaño tras una LM puede contribuir a la creación de un ambiente más favorable para la reparación de la médula espinal, además favorecer la recuperación funcional (Requejo-Aguilar *et al.*, 2017). En la figura 27 puede observarse una loncha transversal representativa para un animal de cada grupo en la que se señalan algunos quistes, mientras que en la figura 28 aparece representada el área media que presentan los quistes para cada uno de los tratamientos tras su cuantificación.

Los resultados indican que el tamaño que alcanzan los quistes es significativamente mayor en los animales trasplantados con células precondicionadas con Fasudil libre, mientras que este área se mantiene similar para las epSPCs sin precondicionar y las precondicionadas con el PGA-SS-Fasudil. Este dato podría indicar, por tanto, que el PGA-SS-Fasudil evita la formación de quistes de gran

tamaño de manera más efectiva que el Fasudil libre. Debido a que la regeneración de la médula requiere un crecimiento de los tractos axonales dirigido, así como la mielinización de axones muy largos, la pérdida de la estructura del tejido a causa de la aparición de quistes, afecta de manera directa al crecimiento axonal y a la migración celular (Ahuja and Fehlings, 2016). Por esta razón, el menor tamaño de los quistes para el PGA-SS-Fasudil podría explicar la mejora funcional de los animales trasplantados con las epSPCs preconditionadas con éste. No obstante, debido a la gran variabilidad observada entre individuos respecto al área ocupada por quistes, es preciso ampliar la n de este análisis para corroborar esta hipótesis.

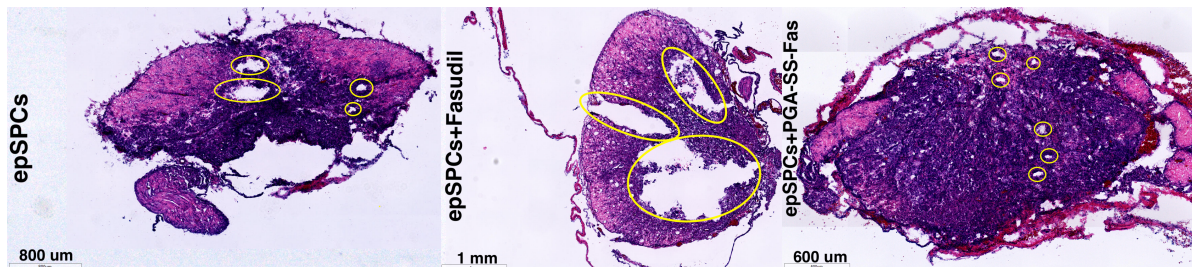


Figura 26. Localización de quistes en cortes transversales de médula teñidos con HE correspondientes al epicentro de la lesión. La nomenclatura corresponde a: epSPCs=células sin preconditionar (n=2), epSPCs+Fasudil=células preconditionadas con Fasudil libre (n=3), epSPCs+PGA-SS-Fasudil= células preconditionadas con Fasudil conjugado (n=3). Los círculos señalan la localización de algunos quistes.

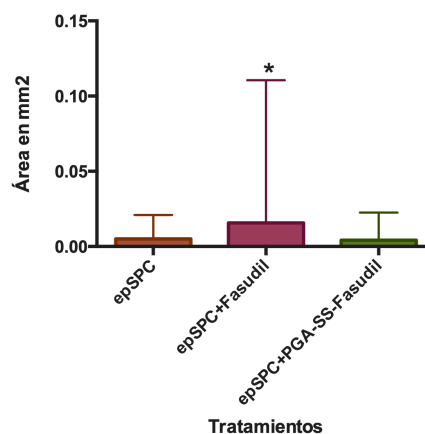


Figura 27. Área media y número de quistes presentes en una loncha de médula espinal. Nomenclatura de los tratamientos: epSPC= únicamente células (n=2), epSPC+Fasudil= células preconditionadas con Fasudil libre (n=3), epSPC+PGA-SS-Fasudil= células preconditionadas con Fasudil conjugado (n=3). Los datos se han representado como media \pm SEM. * Estadísticamente significativo (P value <0.0001) frente al tratamiento con epSPCs.

4.6. Localización y cuantificación de las epSPCs preconditionadas con Fasudil libre y PGA-SS-Fas en la médula tras el trasplante en un modelo de lesión medular in vivo.

Una vez las epSPCs fueron preconditionadas, se inyectaron en el epicentro de la lesión. Con el fin de localizar dichas células en los cortes histológicos obtenidos, se aplicó una tinción mediante técnicas de inmunohistoquímica frente a GFP como marcador de las epSPCs, ya que éstas proceden de una cepa de rata homocigota GFP+/+, la cual expresa GFP en todas las células de su organismo (Figura 29).

En este experimento, se analizaron cortes histológicos transversales procedentes de un animal de cada grupo de tratamiento. De este modo, se tomó muestras de una rata inyectada con epSPCs sin preconditionar, de una rata inyectada con epSPCs preconditionadas con Fasudil libre y de una rata inyectada con epSPCs tratadas con PGA-SS-Fasudil.

Los resultados expresados en la figura 30 muestran el área media ocupada por las células en una loncha transversal de tejido. Como se puede observar en la gráfica, se produce un incremento en el área ocupada por las epSPCs en los casos en los que éstas fueron preconditionadas con Fasudil y PGA-SS-Fasudil. Este dato, parece indicar que el Fasudil y el PGA-SS-Fasudil podrían presentar un efecto sobre la supervivencia celular de las epSPCs inyectadas. Además de su papel en la regulación de la morfología neuronal y crecimiento de neuritas, se ha observado que la activación de la vía Rho/ROCK se correlaciona con la inducción de la apoptosis. Por esta razón, es necesario un estudio más detallado dirigido en esta dirección en el cual se analicen marcadores de supervivencia que corroboren una menor muerte celular para el preconditionamiento con PGA-SS-Fasudil. Además, sería conveniente la ampliación del número de animales para este análisis, ya que como se ha mencionado anteriormente, existe una gran variabilidad entre individuos con respecto a la LM y únicamente se ha analizado un animal por grupo de tratamiento.

Por otro lado, según los datos estadísticos calculados, no existe una significancia estadística entre el área que cubren las células tratadas con Fasudil libre frente a las tratadas con el conjugado. No obstante, en la figura 30 B, puede observarse que el área ocupada por células para el Fasudil conjugado se extiende una mayor longitud a lo largo del segmento de médula analizado.

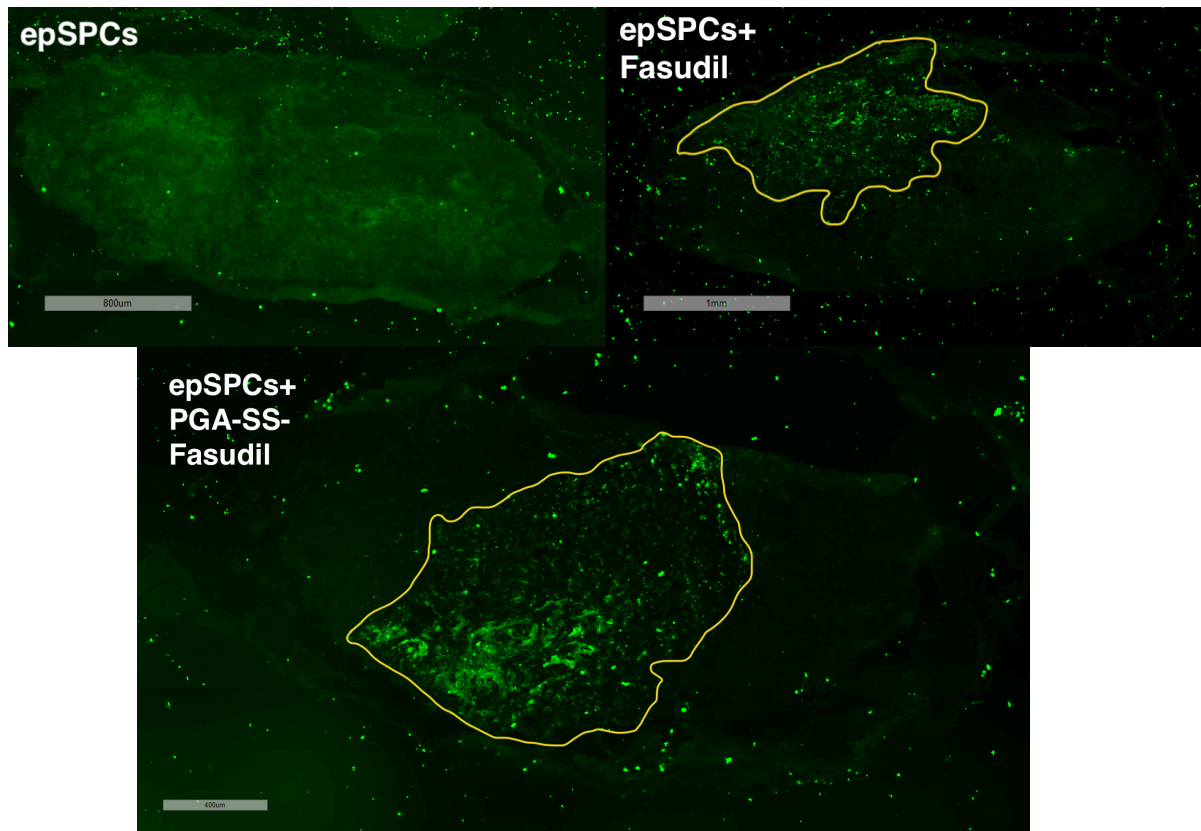


Figura 28. Inmunohistoquímica de lonchas transversales de médula de rata. Se aplicó un anticuerpo anti-GFP para detectar las epSPCs trasplantadas las cuales son positivas para GFP.

Este dato resulta muy interesante, desde el punto de vista de que quizás no se trate de únicamente de un efecto del PGA-SS-Fasudil sobre la supervivencia celular, sino que además está acompañado por la dotación a las células de una mayor capacidad de migración. Así lo muestra la figura 30 B, donde se observa que las células no tratadas se localizan únicamente en los primeros cortes de la médula, mientras que en las células preconditionadas identificamos células a lo largo de la médula, siendo en el grupo preconditionado con PGA-SS-Fasudil donde parece que las células tienen mayor capacidad de migración. No obstante, es necesario realizar futuros experimentos en los que se analicen diversos marcadores que puedan confirmar esta hipótesis, como Caspasa 3 y marcadores de migración como NCAM o PSA-NCAM.

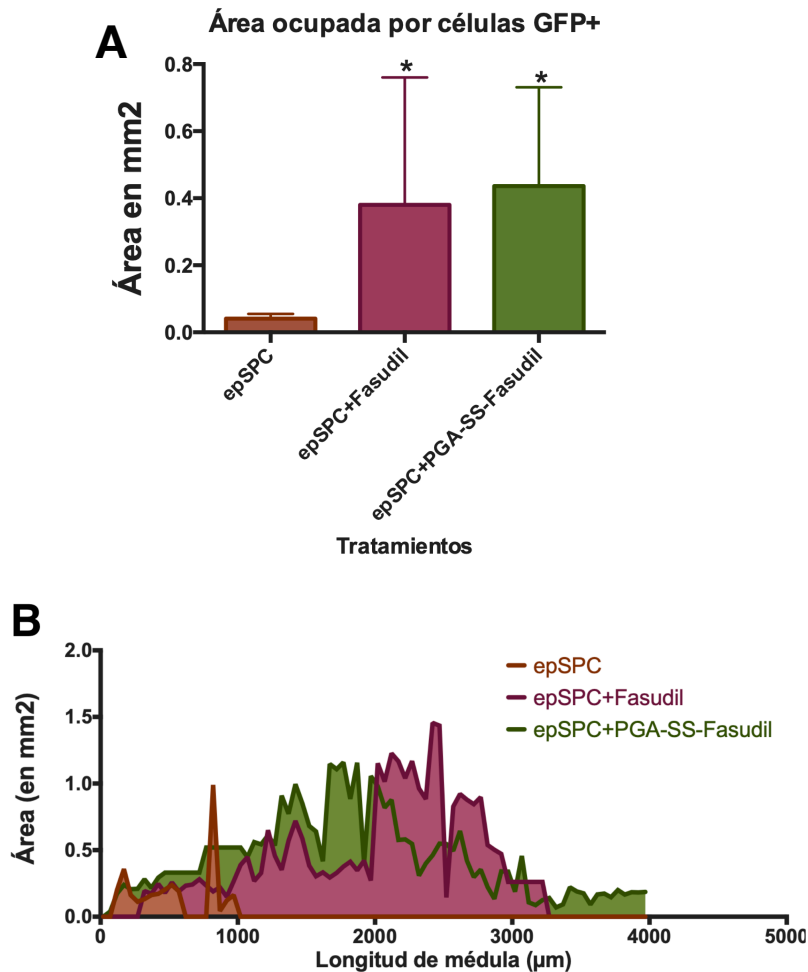


Figura 29. Área media ocupada por células GFP positivas. En la gráfica izquierda se representa el área media que cubren las epSPCs inyectadas en una loncha de tejido. En la gráfica derecha se puede observar la distribución del área ocupada por las células GFP positivas a lo largo de los diferentes cortes analizados. Nomenclatura de los tratamientos: epSPCs=células sin precondicionar (n=1), epSPC+Fasudil=células precondicionadas con Fasudil libre (n=1), epSPC+PGA-SS-Fasudil=células precondicionadas con Fasudil conjugado (n=1). Los datos se han representado como media \pm SEM. Estadísticamente significativo (P value < 0.0001): * frente al trasplante de epSPCs sin tratar.

Además, cuando se observan las imágenes para el tratamiento con PGA-SS-Fasudil a mayor aumento, puede observarse como las células trasplantadas se encuentran más estiradas, lo cual podría corresponderse con una morfología más diferenciada. Es por ello, que para continuar el análisis de estos resultados se estudiará la co-expresión de GFP con marcadores de diferenciación temprana para neuronas como doblecortina o Tuj, marcadores de oligodendrocitos como Olig2 y de astrocitos como GFAP.

4.7. Señalización en un modelo de LM *in vivo*

Akt/PKB (proteína quinasa B) es una familia de serina/treonina quinasas, las cuales actúan como mediadores de rutas de transmisión de señal. Dichas proteínas, son activadas en respuesta a estímulos extracelulares como factores de crecimiento. Tal y como se indica en la figura 31, su activación está relacionada con la regulación del metabolismo celular, la transcripción, el crecimiento y la supervivencia celular (Ortiz-Melón, 2009).

Según un estudio de Lu *et al.* (2018), los niveles de pAKT se redujeron considerablemente tras la LM en comparación con el control en un modelo en rata. Sin embargo, la expresión de AKT se mantuvo a niveles similares, lo que sugirió que la vía PI3K/Akt es inhibida tras la LM.

Las muestras de este experimento corresponden a homogeneizados de médula de rata a las que se produjo una LM y se trasplantó epSPCs sin precondicionar, precondicionadas con Fasudil libre y con PGA-SS-Fasudil. Tras la cuantificación, podemos observar que los niveles de pAKT se mantienen similares para los tres grupos (Figura 32), aunque presentan una leve tendencia a reducirse para el tratamiento con PGA-SS-Fasudil.

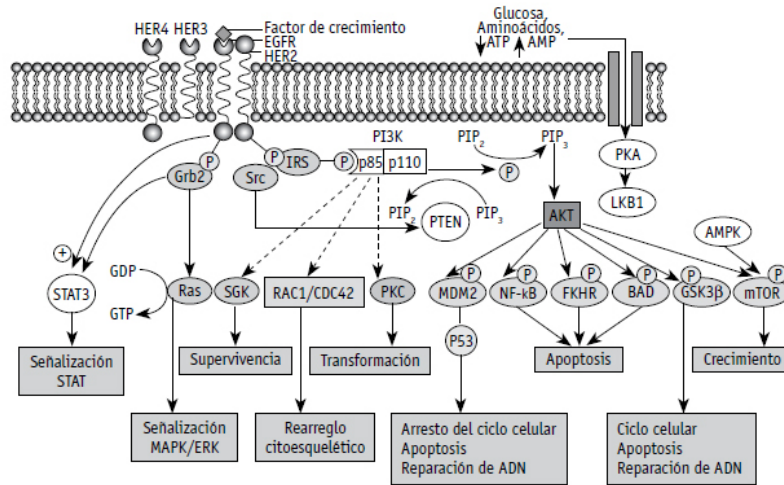


Figura 30. Vía de señalización PI3/Akt. (Hennessy, B.T. *et al.*, 2005)

Por otro lado, se estudió la fosforilación de AMPK. AMPK (AMP-activated protein kinase) es uno de los reguladores centrales del metabolismo celular, el cual es activado con la bajada en los niveles de ATP. AMPK regula el crecimiento celular y se ha relacionado con procesos de autofagia y polaridad celular (Mihaylova and Shaw 2011). Según Wang *et al.* (2018), la autofagia inducida por la activación de AMPK favorece la neuroprotección tras una LM. Además, se ha demostrado que la activación de la ruta de AMPK protege las neuronas de la médula espinal frente al estrés oxidativo (Xu *et al.*, 2017).

Nuestros resultados muestran una aparente reducción de los niveles de expresión de pAMPK para los tratamientos con células precondicionadas, ya sea con Fasudil libre o conjugado (Figura 31). Sin embargo, estudio previos en nuestro laboratorio mostraron que el tratamiento con PGA-SS-Fasudil tras la LM produjo un aumento de pAMPK. En cualquier caso, estos resultados son preliminares y actualmente se está aumentando la n de estos experimentos para poder identificar las vías que se han activado con el tratamiento con PGA-SS-Fasudil para promover un aumento en la supervivencia y la migración de las células trasplantadas, así como una mejor funcional (Resultados en preparación para su publicación). Sin embargo, cabe destacar que estos datos corresponden a una n=1, por lo que no podemos obtener una conclusión determinante con respecto al estudio de señalización.

Con respecto a futuros experimentos, este estudio de señalización no sólo precisa aumentar la n, realizando varias repeticiones, sino que debería ser ampliado de manera que cubra de una forma más extensa la vía de PI3/Akt, con el fin de obtener conclusiones sobre el efecto que ejerce el conjugado de Fasudil sobre esta ruta. Por ejemplo, se ha descrito que la inactivación por fosforilación de GSK3β favorece el crecimiento axonal (Dill *et al.*, 2008), por lo que sería interesante observar si el Fasudil conjugado aumenta los niveles de expresión de pGSK3β. Otra diana interesante sería la activación de mTOR, cuya función está relacionada con la proliferación y el crecimiento celular (Hahn-Windgassen *et al.*, 2005).

Por otra parte, se ha descrito que la activación de la vía Rho/ROCK induce la apoptosis mediante el incremento de la actividad de la ruta de PTEN o de la vía p38/MAPK (Li *et al.*, 2005), mientras que la inhibición de ROCK interfiere con la activación de rutas pro-apoptóticas, lo que resulta en un incremento de la neuroprotección (Koch *et al.*, 2018). Es por ello, que podría estudiarse también la

inactivación de PTEN, molécula reguladora negativa de la vía Akt que impide la supervivencia celular. Según Wu *et al.* (2012), el Fasudil activa la vía Akt e inactiva PTEN previniendo la apoptosis, hecho que podría investigarse en nuestro caso para el Fasudil conjugado.

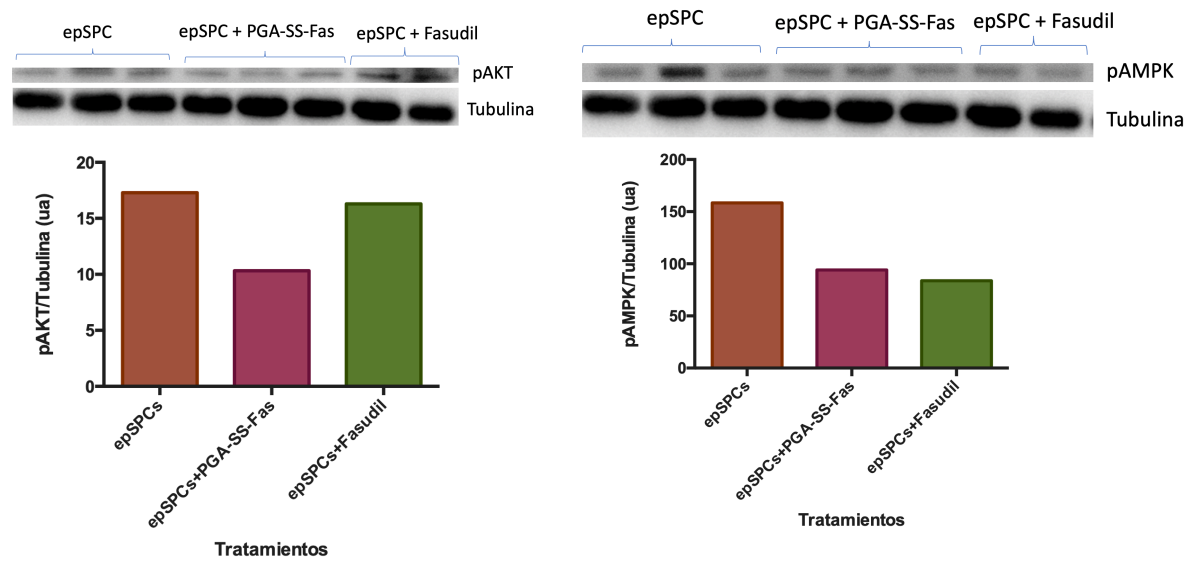


Figura 31. Expresión de pAKT y pAMPK según el acondicionamiento de las epSPCs inyectadas en cada grupo de animales: epSPCs, epSPCs + PGA-SS-Fas (conjugado), epSPCs +Fasudil (libre) ($n=1$).

5. Conclusiones

La LM es una patología devastadora caracterizada por una pérdida de la función motora y sensorial, la cual es producida, en parte, por la degeneración del tejido y el daño neuronal. La incapacidad de regeneración del SNC se basa en la exposición de los axones dañados a un ambiente inhibitorio del crecimiento, el cual induce la activación de cascadas de señalización que frenan la regeneración axonal, entre las cuales se encuentra la vía Rho/ROCK.

A pesar de los beneficios que presentan tanto la terapia celular como la terapia farmacológica, la complejidad de la lesión ha abierto las puertas al estudio de terapias combinatorias que favorezcan la neuroprotección a la vez que induzcan la regeneración del tejido dañado.

El Fasudil es un inhibidor de ROCK, el cual presenta una baja eficacia debido a su corta vida media en la circulación y su dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica. Por esta razón, se ha diseñado un conjugado de poliglutamato del Fasudil (PGA-SS-Fasudil), el cual aumenta la vida media del compuesto y permite su liberación de manera más prolongada en el tiempo. En este proyecto, hemos evaluado el efecto del conjugado de PGA del Fasudil como inhibidor de la vía Rho/ROCK sobre el preconditionamiento de epSPCs en un modelo de LM *in vitro*, así como el trasplante de epSPCs preconditionadas con Fasudil conjugado en un modelo de LM *in vivo*.

Las conclusiones a las que se ha llegado tras el desarrollo de este trabajo experimental son las siguientes.

En primer lugar, los resultados de este estudio indican que el PGA-SS-Fasudil no sólo incrementa la longitud de las neuritas de epSPCs *in vitro*, sino que es capaz de contrarrestar la retracción de las mismas inducida por la adición de LPA al medio de cultivo de manera significativa frente al Fasudil libre. Este dato resulta muy prometedor, ya que la extensión de las prolongaciones celulares podría ayudar en la integración y migración de las células tras su inyección en la médula.

Por otro lado, se ha observado que el preconditionamiento de epSPCs con PGA-SS-Fasudil podría favorecer la diferenciación espontánea de las epSPCs *in vitro* hacia neuronas, lo que podría resultar en una mejor recuperación funcional, ya que se trata del tipo celular más afectado tras la lesión. Sin embargo, el porcentaje final de oligodendrocitos parece verse reducido cuando se aplica el tratamiento con Fasudil conjugado, lo cual podría dificultar la remielinización de los axones, retrasando la recuperación.

Además, se ha observado que el trasplante de epSPCs preconditionadas con PGA-SS-Fasudil en un modelo de LM *in vivo* podría evitar la formación de quistes de gran tamaño, favoreciendo la protección de los axones y la recuperación funcional, a pesar de no presentar diferencias significativas respecto al número de motoneuronas preservadas.

Por último, el dato más prometedor de este estudio es que el preconditionamiento de epSPCs con Fasudil conjugado podría favorecer la supervivencia celular y además dotar a las células trasplantadas de una mayor capacidad de migración a lo largo y ancho de la médula espinal.

6. Referencias

- AHUJA, CS. AND FEHLINGS, M., 2016. Concise review: Bridging the gap: Novel neuroregenerative and neuroprotective strategies in spinal cord injury. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(7):914-924. DOI: 10.5966/sctm.2015-0381
- BARBER, R. P., PHELPS, P. E., HOUSER, C. R., CRAWFORD, G. D., SALVATERRA, J. E. AND VAUGHN, J. E., 1984. The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study. *Journal of comparative neurology*, 229, 329-346. DOI: 10.1002/cne.902290305
- BRUNI, J.E., 1998. Ependymal development, proliferation and functions: A review. *Microscopy Research and Technique*, 41(1), 2-13. DOI: 10.1002(SICI)1097-0029(19980401)41:1<2::AID-JEMT2>3.0.CO;2-Z
- CAI, D., QIU, J., CAO, Z., MCATEE, M., BREGMAN, B. S. AND FILBIN, M. T., 2001. Neuronal Cyclic AMP Controls the Developmental Loss in Ability of Axons to Regenerate. *Journal of Neuroscience*, 21 (13), 4731-4739. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-13-04731.2001
- Cell therapies, 2019. Nature.com. Retrieved 14 April 2019, from <https://www.nature.com/subjects/cell-therapies>.
- Cell therapy, 2015. Inserm. Retrieved 14 April 2019, from <https://www.inserm.fr/en/health-information/health-and-research-from-z/cell-therapy>.
- CHEN, C., YU, J.Z., ZHANG, Q., ZHAO, Y.F., LIU, C.Y., LI, Y.H., YANG, W.F., MA, C.G. AND XIAO, B.G., 2015. Role of Rho Kinase and Fasudil on Synaptic Plasticity in Multiple Sclerosis. *Neuromolecular Medicine*, 17(4), 454-465. DOI: 10.1007/s12017-015-8374-6
- DALAMAGKAS, K., TSINTOU, M., SEIFALIAN, A. AND SEIFALIAN, A. M., 2018. Translational Regenerative Therapies for Chronic Spinal Cord Injury. *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1776. DOI:10.3390/ijms19061776
- DAVID, S. AND KRONER, A., 2011. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 12, 388–399. DOI: 10.1038/nrn3053
- DAVIES, S. P., REDDY, H., CAIVANO, M. AND COHEN, P., (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *The Biochemical journal*, 351(1), 95–105. DOI:10.1042/0264-6021:3510095
- DEUMENS, R., 2005. Regeneration of descending axon tracts after spinal cord injury. *Progress in Neurobiology*, 77(1-2), 57-89. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2005.10.004
- DILL, J., WANG, H., ZHOU, F., & LI, S. (2008). Inactivation of Glycogen Synthase Kinase 3 Promotes Axonal Growth and Recovery in the CNS. *Journal Of Neuroscience*, 28(36), 8914- 8928. DOI: 10.1523/jneurosci.1178-08.2008
- DUNCAN, R. AND GASPAR, R., 2011. Nanomedicine(s) under the Microscope. *Molecular Pharmaceutics*, 8(6), 2101-2141. DOI: 10.1021/mp200394t
- DURO-CASTANO, A., CONEJO-SÁNCHEZ, I. AND VICENT, M., 2014. Peptide-Based Polymer Therapeutics. *Polymers*, 6(2), 515-551. DOI: 10.3390/polym6020515
- FEHLINGS, M. G. AND TATOR, C. H., 1995. The relationships among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 132 (2), 220-228. DOI: 10.1016/0014-4886(95)90027-6
- FERNÁNDEZ-KLETT AND F., PRILLER, J., 2014. The fibrotic scar in neurological disorders. *Brain Pathology*, 24, 404 – 413. DOI: 10.1111/bpa.12162
- FRISCA, F., CROMBIE, D.E., DOTTORI, M., GOLDSHMIT, Y., PÉBAY, A., 2013. Rho/ROCK pathway is essential to the expansion, differentiation, and morphological rearrangements of human neural stem/progenitor cells induced by lysophosphatidic acid. *The Journal of Lipid Research*, 54(5),1192-206. DOI: 10.1194/jlr.M032284
- FUJITA, Y. AND YAMASHITA, T., 2014. Axon growth inhibition by RhoA/ROCK in the central nervous system. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 338. DOI: 10.3389/fnins.2014.00338
- FUKUTA, T., ASAI, T., SATO, A., NAMBA, M., YANAGIDA, Y., KIKUCHI, T., KOIDE, H., SHIMIZU, K. and OKU, N. (2016). Neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by intravenous administration of liposomal fasudil. *International Journal of Pharmaceutics*, 506(1- 2), pp.129-137. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.046.
- GALEIRAS VÁZQUEZ, R., 2016. Actualización en lesión medular aguda postraumática. Parte 1. *Medicina intensiva*, 41(4), 201-264. DOI: 10.1016/j.medin.2016.11.002

- GÓMEZ-VILLAFUERTE, R., RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, F.J., ALASTRUE-AGUDO, A., STOJKOVIC, M., MIRAS-PORTUGAL, M.T. AND MORENO-MANZANO, V., 2015. Purinergic Receptors in Spinal Cord-Derived Ependymal Stem/Progenitor Cells and Their Potential Role in Cell-Based Therapy for Spinal Cord Injury. *Cell Transplantation*, 24(8), 1493-1509. DOI: 0.3727/096368914X682828
- GRUPTA, V., GUPTA, N., SHAIK, I., MEHVAR, R., MCMURTRY, I., OKA, M., NOZIK-GRAYCK, E., KOMATSU, M. AND AHSAN, F., 2013. Liposomal fasudil, a rho-kinase inhibitor, for prolonged pulmonary preferential vasodilation in pulmonary arterial hypertension. *Journal of Controlled Release*, 167(2), 189-199. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.01.011
- HAHN-WINDGASSEN, A., NOGUEIRA, V., CHEN, C., SKEEN, J., SONENBERG, N., & HAY, N. (2005). Akt Activates the Mammalian Target of Rapamycin by Regulating Cellular ATP Level and AMPK Activity. *Journal Of Biological Chemistry*, 280(37), 32081-32089. DOI: 10.1074/jbc.m502876200
- HALL, A. AND NOBES, C.D., 2000. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 355(1399), 965–970. DOI: 10.1098/rstb.2000.0632
- HENNESSY, B.T., SMITH, D.L., RAM, P.T., LU, Y., MILLS, G.G., 2005. Exploiting the PI3/Akt pathway for cancer drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 988-1004. DOI: 10.1038/nrd1902
- HULSEBOSCH, C.E., 2002. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Advances in Physiology Education*, 26(4), 238-255. DOI: 10.1152/advan.00039.2002
- IMPELLIZERI, D., MAZZON, E., PATERNITI, I., ESPOSITO, E. AND CUZZOCREA, S., 2012. Effect of Fasudil, a Selective Inhibitor of Rho Kinase Activity, in the Secondary Injury Associated with the Experimental Model of Spinal Cord Trauma. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 343(1), 21-33. DOI: 10.1124/jpet.111.191239
- JAMESON, J. L., FAUCI, A. S., KASPER, D. L., HAUSER, S. L., LONGO, D. L. AND LOSCALZO, J., 1950. *Harrison. Principios de medicina interna*. Editorial Mc Grad Hill Education, Madrid.
- JOHANSSON, B. B., 2007. Regeneration and Plasticity in the Brain and Spinal Cord. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 27(8), 1417–1430. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600486
- KOCH, J. C., TATENHORS, L., ROSER, A. E., SAAL, K. A., TÖNGES, L. AND LINGOR, P., 2018. ROCK inhibition in models of neurodegeneration and its potential for clinical translation. *Pharmacology and Therapeutics*, 189, 1-21. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.03.008
- LAU, B.Y.B., FOGERSON, S.M., WALSH, R.B., MORGAN, J.R., 2013. Cyclic AMP promotes axon regeneration, lesion repair and neuronal survival in lampreys after spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 250, 31-42. DOI: 10.1016/j.expneurol.2013.09.004
- LI, Q., YUCONG, P., FAN, L., XU, H., HE, P., CAO, S., LI, J., CHEN, T., RUAN, W. AND CHEN, G., 2018. Phosphodiesterase-4 inhibition confers a neuroprotective efficacy against early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage in rats by attenuating neuronal apoptosis through the SIRT1/Akt pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 99, 947-955. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.093
- LI, Z., DONG, X., WANG, Z., LIU, W., DENG, N., BING, Y., TANG, J., HLA, T., ZENG, R., LI, L. AND WU, D., 2005. Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nature Cell Biology*, 7(4), 399-404. DOI: 10.1038/ncb1236
- LINGOR, P., TEUSCH, N., SCHWARZ, K., MUELLER, R., MACK, H., BÄHR, M. AND MUELLER, B. K., 2007. Inhibition of Rho kinase (ROCK) increases neurite outgrowth on chondroitin sulphate proteoglycan in vitro and axonal regeneration in the adult optic nerve in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 103, 181–189. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04756.x
- LIU, J., GAO, HY. AND WANG, XF., 2015. The role of the Rho/ROCK signaling pathway in inhibiting axonal regeneration in the central nervous system. *Neural Regeneration Research*, 10, 1892-1896. DOI: 10.4103/1673-5374.170325
- LIU, K., LU, Y., LEE, J. K., SAMARA, R., WILLENBERG, R., SERA-KRAXBERGER, I. AND HE, Z., 2010. PTEN deletion enhances the regenerative ability of adult corticospinal neurons. *Nature neuroscience*, 13(9), 1075–1081. DOI: 10.1038/nn.2603
- LU, H., ZHANG, L., YANG, L., AND TANG, P., 2018. The PI3K/Akt/FOXO3a pathway regulates regeneration following spinal cord injury in adult rats through TNF- α and p27kip1 expression. *International Journal of Molecular Medicine*, 41, 2832-2838. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3459

- MAURICIO-RUEDA, C., VELILLA, P. A., ROJAS, M. Y RUGELES, M. T., 2012. AMPc: una molécula clave en los eventos de regulación inmune y en el control de la replicación del VIH. *Infectio*, 16(1), 59-71. DOI: 10.1016/S0123-9392(12)70058-9
- MELETIS, K., BARNABE-HEIDER, F. AND CARLEN, M., 2008. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *Plos Biology*, 6, 182. DOI: 0.1371/journal.pbio.0060182
- MIHAYLOVA, M. M. AND SHAW, R. J., 2011. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature cell biology*, 13(9), 1016–1023. DOI: 10.1038/ncb2329
- MIKAMI, Y., OKANO, H., SAKAGUCHI, M., NAKAMURA, M., SHIMAZAKI, T., OKANO, H.J., KAWAKAMI, Y., TOYAMA, Y. AND TODA, M., 2004. Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery. *Journal of Neuroscience Research*, 76(4), 453-465. DOI: 10.1002/jnr.20086
- REQUEJO-AGUILAR, R., ALASTRUE-AGUDO, A., CASES-VILLAR, M., LOPEZ-MOCHOLI, E., ENGLAND, R., VICENT, M.J., MORENO-MANZANO, V. 2017. Combined polymer-curcumin conjugate and ependymal progenitor/stem cell treatment enhances spinal cord injury functional recovery. *Biomaterials*, 113, 18-30. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.10.032
- MORENO-MANZANO, V., RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, F. J., GARCÍA-ROSELLÓ, M., LÁINEZ, S., ERCEG, S., CALVO, M. T., RONAGHI, M., LLORET, M., PLANELLS-CASES, R., SÁNCHEZ-PUELLES, J. M., STOJKOVICA, M., 2009. Activated Spinal Cord Ependymal Stem Cells Rescue Neurological Function. *Stem cells*, 27(3), 733-743. DOI: 10.1002/stem.24
- MUELLER, B., MACK, H. AND TEUSCH, N., 2005. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(5), 387-398. DOI: 10.1038/nrd1719
- MURADOV, J. M., EWAN, E. E. AND HAGG, T., 2013. Dorsal column sensory axons degenerate due to impaired microvascular perfusion after spinal cord injury in rats. *Experimental Neurology*, 249, 59-73. DOI: 10.1016/j.expneurol.2013.08.009
- NARUMIYA, S., TANJI, M. AND ISHIZAKI, T., 2009. Rho signaling, ROCK and mDial1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer and metastasis Review*, 28(1-2), 65-76. DOI: 10.1007/s10555-008-9170-7
- NASCIMENTO, A. M., COELHO-SAMPAIO, T. AND SOROKIN, L., 2018. Fractone bulbs derive from ependymal cells and their laminin composition affects cell proliferation in the subventricular zone. *The Journal of Neuroscience*, 38(16), 3880-3889. DOI: 10.1523/jneurosci.3064-17.2018
- NELSON, W. T., 2009. Remodeling epithelial cell organization: transitions between front-rear and apical-basal polarity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(1), a000513. DOI: 10.1101/cshperspect.a000513
- ORTIZ-MELÓN, J. M., 2009. Proteína quinasas como dianas farmacológicas. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. DOI: ES/monoranf.v0i0.808
- PARR, A. M., TATOR, C. H. AND KEATING, A., 2007. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplant*, 40(7), 609–619. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705757
- PEACE A. G. AND SHEWAN D. A., 2011. New perspectives in cyclic AMP-mediated axon growth and guidance: The emerging epoch of Epac. *Brain Research Bulletin*, 84(4-5), 280-8. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2010.09.002
- PEARSE, D. D., PEREIRA, F. C., MARCILLO, A. E., BATE, M. L., BERROCAL, Y. A., FILBIN, M. T. AND BUNGE, M. B., 2004. cAMP and Schwann Cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *Nature Medicine*, 10, 610-616. DOI: 10.1038/nm1056
- PLEMEL, J.R., KEOUGH, M.B., DUNCAN, G.J., SPARLING, J.S, YONG, V.W., STYS, P.K AND TETZLAFF, W., 2014. Remyelination after spinal cord injury: is it a target for repair? *Progress in Neurobiology*, 117, 54-72. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2014.02.006
- QI, B., SUN, R., RONG, J., PENG, Z. AND WANG, Y., 2019. Cyclic adenosine phosphate improves functional recovery after spinal cord injury via activating unfolded protein response. *Pharmazie*, 74(2),115-119. DOI: 10.1691/ph.2019.8347
- RICCI-VITIANI, L., CASALBORE, P., PETRUCCI, G., LAURETTI, L., MONTANO, N., LAROCCA, L.M., FALCHETTI, M.L., LOMBARDI, D.G., GEREVINI, V.D., CENCIARELLI, C., D’ALESSANDRIS, Q.G., FERNANDEZ, E., DE MARIA, R., MAIRA, G., PESCHLE, C., PARATI, E. AND PALLINI, R., 2006. Influence of local environment on the differentiation of neural stem cells

engrafted onto the injured spinal cord. *Neurological Research*, 28(5), 488-492. DOI: 10.1179/016164106X115134

RUBIN, M., 2016. *Cavidad siringomiélica de la médula espinal o el tronco encefálico*. MANUAL MSD. Obtenido de: <https://www.msmanuals.com/es-es/professional/trastornos-neurológicos/trastornos-de-la-médula-espinal/cavidad-siringomiélica-de-la-médula-espinal-o-el-tronco-encefálico>

SALEWSKI, R.P., MITCHELL, R.A., SHEN, C. AND FEHLINGS, M.G., 2015. Transplantation of neural stem cells clonally derived from embryonic stem cells promotes recovery after murine spinal cord injury. *Stem Cells and Development*, 24(1), 36-50. DOI: 10.1089/scd.2014.0096

SASAKI, Y., SUZUKI, M. AND HIDAKA, H., 2002. The novel and specific Rho-kinase inhibitor (S)-(+)-2-methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinoline)sulfonyl]-homopiperazine as a probing molecule for Rho-kinase-involved pathway. *Pharmacology and Therapeutics*, 93(2-3), 225-232. DOI: 10.1016/S0163-7258(02)00191-2

SAYAS, C.L., AVILA, J. AND WANDOSELL, F., 2002. Regulation of neuronal cytoskeleton by lysophosphatidic acid: role of GSK-3. *Biochimica et Biophysica Acta*, 23, 1582(1-3), 144-153. DOI: 10.1016/s1388-1981(02)00149-x

SAYAS, C.L., MORENO-FLORES, M.T., AVILA, J. AND WANDOSELL, F., 1999. The neurite retraction induced by Lysophosphatidic acid increases Alzheimer's disease-like Tau phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(52), 37046-37052. DOI: 10.1074/jbc.274.52.37046

SHIBUYA, M., HIRAI, S., SETO, M., SATOH, S. AND OHTOMO, E., 2005. Effects of fasudil in acute ischemic stroke: Results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. *Journal of the Neurological Sciences*, 238(1-2), 31-39. DOI: 10.1016/j.jns.2005.06.003

SHIMOKAWA, H., 2002. Rho-kinase as a novel therapeutic target in treatment of cardiovascular diseases. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 39(3), 319-327. DOI: 10.1097/00005344-200203000-00001

SNYDER, E. Y. AND TENG, Y. D., 2012. Stem Cells and Spinal Cord Repair. *The New England Journal of Medicine*, 366(20), 1940-1942. DOI: 10.1056/NEJMcibr1200138

SILVER, J. AND MILLER, J. H., 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 146-156. DOI: 10.1038/nrn1326

TAN, H. B., ZHONG, Y.S., CHENG, Y., AND SHEN, X., 2011. Rho/ROCK pathway and neural regeneration: a potential therapeutic target for central nervous system and optic nerve damage. *International journal of ophthalmology*, 4(6), 652-657. DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2011.06.16

TRAN, A.P., WARREN, P.M., AND SILVER, 2018. The Biology of Regeneration Failure and Success After Spinal Cord Injury. *Physiological reviews*, 98(2), 881-917. DOI: 10.1152/physrev.00017.2017

TUSZYNSKI, M. H. AND STEWARD, O., 2012. Concepts and Methods for the Study of Axonal Regeneration in the CNS. *Neuron*, 74(5), 777-791. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.05.006

VAN NIEKERK, E. A., TUSZYNSKI, M. H., LU, P. AND DULIN, J.N., 2016. Molecular and cellular mechanisms of axonal regeneration after spinal cord injury. *Molecular and Cellular Proteomics*, 15(2), 394-408. DOI: 10.1074/mcp.R115.053751

VOLAREVIC, V., ERCEG, S., BHATTACHARYA, S. S, STOJKOVIC, P., HORNER, P. AND STOJKOVIC, M., 2013. Stem cell-based therapy for spinal cord injury. *Cell Transplant*, 22, 1309-1323. DOI: 10.3727/096368912X657260

WANG, P., ZHONG-DONG, X., XIE, C., LIN, C., WANG, J., XUAN, L., ZHANG, C., WANG, Y., HUANG, Z., TENG, H., 2018. AMP-activated protein kinase-dependent induction of autophagy by erythropoietin protects against spinal cord injury in rats. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 24, 1185-1195. DOI: 10.1111/cns.12856

WATZLAWICK, R., SENA, E.S., DIRNAGL, U., BROMMER, B., KOPP, M.A., MACLEOD, M.R., HOWELLS, D.W. AND SCHWAB, J.M., 2014. Effect and reporting bias of RhoA/ROCK-blockade intervention on locomotor recovery after spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Neurology*, 71(1), 91-99. DOI: 10.1001/jamaneurol.2013.4684.

WEI, D., HURD, C., GALLEGUILLOS, D., SINGH, J., FENRICH, K., WEBBER, C., SIPIONE, S. AND FOUAD, K., 2016. Inhibiting cortical protein kinase A in spinal cord injured rats enhances efficacy of rehabilitative training. *Experimental Neurology*, 283(A), 365-374. DOI: 10.1016/j.expneurol.2016.07.001

WU, J., LI, J., HU, H., LIU, P., FANG, Y., & WU, D. (2012). Rho-Kinase Inhibitor, Fasudil, Prevents Neuronal Apoptosis via the Akt Activation and PTEN Inactivation in the Ischemic Penumbra of Rat Brain. *Cellular And Molecular Neurobiology*, 32(7), 1187-1197. DOI: 10.1007/s10571-012-9845-z

WU, X. AND XU, XM., 2016. RhoA/Rho kinase in spinal cord injury. *Neural Regen Res*, 11, 23-27. DOI: 10.4103/1673-5374.169601

XU, J., WU, L., ZHANG, Y., GU, H., HUANG, Z., ZHOU, K. AND YIN, X., 2017. Activation of AMPK by OSU53 protects spinal cord neurons from oxidative stress. *Oncotarget*, 8(68), 112477–112486. DOI:10.18632/oncotarget.22055

6. 1. Bibliografía consultada

BOOMKAMP, S. D., RIEHLE, M. O., WOOD, J., OLSON, M. F. AND BARNETT, S. C., 2012. *The development of a rat in vitro model of spinal cord injury demonstrating the additive effects of rho and ROCK inhibitors on neurite outgrowth and myelination*. *Glia*, 60(3), 441-56. DOI: 10.1002/glia.22278

DERGHAM, P., ELLZAM, B., ESSAGIAN, C., AVEDISSIAN, H., LUBELL, W. D. AND MCKERRACHER, L., 2002. *Rho Signaling Pathway Targeted to Promote Spinal Cord Repair*. *Journal of Neuroscience*, 22(15), 6570-6577; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-15-06570.2002

LI, Q., YUCONG, P., FAN, L., XU, H., HE, P., CAO, S., LI, J., CHEN, T., RUAN, W. AND CHEN, G., 2018. *Phosphodiesterase-4 inhibition confers a neuroprotective efficacy against early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage in rats by attenuating neuronal apoptosis through the SIRT1/Akt pathway*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 99, 947-955. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.093

LINGOR, P., WEBER, M., CAMU, W., FRIEDE, T., HILGERS, R. AND LEHA, A., 2019. *ROCK-ALS: Protocol for a Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Phase IIa Trial of Safety, Tolerability and Efficacy of the Rho Kinase (ROCK) Inhibitor Fasudil in Amyotrophic Lateral Sclerosis*. *Frontiers in neurology*, 10, 293. DOI: 10.3389/fneur.2019.00293

MASUMOTO, A., MOHRI, M., SHIMOKAWA, H., URAKAMI, L., USUI, M. AND TAKESHITA, A., 2002. *Suppression of coronary artery spasm by the Rho-kinase inhibitor fasudil in patients with vasospastic angina*. *Circulation*, 105 (13), 1545-7. DOI: 10.1161/hc1002.105938

MORENO-MANZANO, V. AND OLTRA GARCÍA, E., 2018. *Culturing Adult Stem Cells for Cell-Based Therapeutics: Neuroimmune Applications*. *IntechOpen*, 6, 112-138. DOI: 10.5772/intechopen.80714