



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Estudio del efecto de la estimulación optogenética sobre el trasplante de precursores neurales en un modelo de lesión medular

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Martínez Garrido, Paula

Tutor/a: Giraldo Reboloso, Esther

Cotutor/a externo: MORENO MANZANO, MARIA VICTORIA

Director/a Experimental: SANCHEZ MARTIN, MARIA DEL MAR

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

TÍTULO:

Estudio del efecto de la estimulación optogenética sobre el trasplante de precursores neurales en un modelo de lesión medular

RESUMEN:

La lesión medular (LM) se refiere a cualquier daño en la médula espinal dando lugar a discapacidad motora, sensorial y autonómica y teniendo consecuencias devastadoras para la persona afectada tanto a nivel de salud como en la dimensión social. A pesar de las numerosas investigaciones con resultados prometedores de las últimas décadas, todavía no existe una terapia efectiva que permita una recuperación funcional considerable de los pacientes con lesión medular que haya sido trasladada a la clínica. Las estrategias en investigación actuales se centran en promover la neuroprotección y neuroregeneración pudiendo ambas conseguirse mediante el trasplante de progenitores neurales (NPCs). No obstante, a pesar de los resultados esperanzadores obtenidos hasta el momento, la terapia celular también puede limitar la recuperación funcional tras el trasplante, principalmente debido a la pobre supervivencia celular y su fracaso en la integración del circuito de la médula espinal del paciente. Asimismo, nuevos enfoques dirigidos a la manipulación de las células a trasplantar están ganando importancia en el contexto de la terapia celular.

La optogenética representa un abordaje innovador combinando métodos ópticos y genéticos. A través de la expresión ectópica de proteínas fotosensibles, esta técnica permite un preciso control temporal y espacial de poblaciones celulares específicas sometidas a fotoestimulación.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la estimulación optogenética *in vivo* de NPCs trasplantadas tras la lesión medular. Para explorar el impacto terapéutico de este enfoque empleamos la canalrodopsina-2 (ChR2), un canal de cationes cuya apertura está mediada por luz, que fue expresada ectópicamente en células progenitoras neurales las cuales fueron trasplantadas en un modelo de lesión medular subaguda *in vivo* en rata mediante hemisección a nivel de la vértebra T8.

La activación optogenética *in vivo* fue llevada a cabo usando un dispositivo medular de NeuroLux que presentaba unido un μ -LED azul. Las ratas recibieron 1h de estimulación diaria durante un total de 4 semanas a 20 Hz con periodos de 5ms de encendido y 45 ms de apagado. Con el objetivo de evaluar los efectos neuroprotectores de la estimulación optogenética en la lesión medular, se analizó la supervivencia y la identidad celular y el fenotipo de las ChR2-NPCs trasplantadas, así como, la preservación y activación de neuronas propias tras la lesión medular en animales estimulados mediante optogenética y en animales no estimulados. De igual forma, también se analizó la variación del tamaño del área de la lesión.

Los resultados obtenidos muestran un efecto positivo de la estimulación optogenética *in vivo* sobre la diferenciación de las NPCs trasplantadas a neuronas y la disminución del área de la lesión. Asimismo, aunque los valores carecen de significancia estadística, también se observa una mayor activación de las células del injerto, así como una supervivencia incrementada.

Palabras clave: lesión medular; optogenética; terapia celular; progenitores neurales.

TITLE:

Study of the effect of optogenetic stimulation on the transplantation of neural precursor cells in a model of spinal cord injury

ABSTRACT:

Spinal cord injury (SCI) refers to any damage on the spinal cord leading to motor, sensory and autonomic impairment, having devastating consequences for the affected person at self-health and social dimensions. Despite many research efforts with promising outcomes in the last decades, still no effective therapy that allows considerable functional recovery of SCI patients has been translated to the clinic. Current therapeutic strategies under research are focused in promoting neuroprotection and neuroregeneration, and both can be achieved by neural progenitor cells (NPCs) transplantation. Despite the promising results reported, cell therapy also can limit functional recovery after transplant, mainly to the poor cell survival after transplantation and their lack of integration into spinal cord host circuitry. New approaches directed at manipulating cell transplants are gaining attention in the context of cell therapy.

Optogenetics represents an innovative approach combining optical and genetic methods. Through the ectopic expression of photosensitive proteins, this technique allows for a precise temporal and spatial control of specific cell populations upon photostimulation.

The aim of this work was to study the effect of in vivo optogenetic stimulation of transplanted NPCs following SCI. To explore the therapeutic impact of this approach, we employed channelrhodopsin-2 (ChR2), a light-gated cation channel, that was ectopically expressed in neural progenitor cells which were transplanted in an in vivo subacute rat model of SCI by hemisection at the level of the T8 vertebra.

In vivo optogenetic activation was carried out using NeuroLux spinal cord device which has tethered a blue μ -LED. Rats received 1h of stimulation every day for a total of 4 weeks at 20 Hz with 5 ms on and 45 ms off. In order to evaluate the neuroprotective effects of optogenetic stimulation in SCI, we analysed cell survival, cell identity and phenotype of transplanted ChR2-NPCs, as well as, the preservation and activation of host neurons following SCI in optogenetic stimulated and non-stimulated animals. Similarly, the variation in the size of the lesion area was also analysed.

The results obtained show a positive effect of optogenetic stimulation on the differentiation of the NPCs transplanted to neurons and the reduction of the area of the lesion. Likewise, although the values lack statistical significance, a greater activation of the graft cells is also observed, as well as increased survival.

Keywords: spinal cord injury; optogenetics; cellular therapy; neural progenitors.

TÍTOL:

Estudi de l'efecte de l'estimulació optogenètica sobre el trasplantament de precursors neurals en un model de lesió medul·lar.

RESUM:

La lesió medul·lar (LM) es refereix a qualsevol dany en la medul·la espinal i que dona lloc a discapacitat motora, sensorial i autonòmica i té conseqüències devastadores per a la persona afectada tant a nivell de salut com a la dimensió social. Malgrat les nombroses investigacions amb resultats prometedors de les últimes dècades, encara no existeix una teràpia efectiva que permeti una recuperació funcional considerable dels pacients amb lesió medul·lar que haja sigut traslladada a la clínica. Les estratègies en investigació actuals es centren en promoure la neuroprotecció i neuroregeneració i poden ambdues aconseguir-se mitjançant el trasplant de progenitors neurals (NPCs). No obstant això, malgrat els resultats esperançadors obtinguts fins al moment, la teràpia cel·lular també pot limitar la recuperació funcional després del trasplantament, principalment degut a la baixa supervivència cel·lular i al seu fracàs en la integració del circuit de la medul·la espinal del pacient. Així mateix, nous enfocaments dirigits a la manipulació de les cèl·lules a trasplantar estan guanyant importància en el context de la teràpia cel·lular.

L'optogenètica representa un abordatge innovador combinant mètodes òptics i genètics. A través de l'expressió ectòpica de proteïnes fotosensibles, aquesta tècnica permet un precís control temporal i espacial de poblacions cel·lulars específiques sotmeses a fotoestimulació.

L'objectiu d'aquest treball va ser estudiar l'efecte de l'estimulació optogenètica *in vivo* de NPCs trasplantades després de la lesió medul·lar. Per explorar l'impacte terapèutic d'aquest enfocament emprem la canalrodopsina-2, un canal de cations l'obertura del qual està mediada per llum, que va ser expressada ectòpicament en cèl·lules progenitores neurals les quals van ser trasplantades en un model de lesió medul·lar subaguda *in vivo* en rata mitjançant hemisecció a nivell de la vèrtebra T8.

L'activació optogenètica *in vivo* va ser duta a terme utilitzant un dispositiu medul·lar de NeuroLux que presentava unit un μ -LED blau. Les rates van rebre 1h d'estimulació diària durant un total de 4 setmanes a 20 Hz amb períodes de 5ms d'encesa i 45ms d'apagat. Amb l'objectiu d'avaluar els efectes neuroprotectors de l'estimulació optogenètica en la lesió medul·lar, es va analitzar la supervivència i l'identitat cel·lular i el fenotip de les ChR2-NPCs trasplantades, així com, la preservació i activació de neurones pròpies després de la lesió medul·lar en animals estimulats mitjançant optogenètica i en animals no estimulats. De la mateixa manera, també es va analitzar la variació de la mida de l'àrea de la lesió.

Els resultats obtinguts mostren un efecte positiu de l'estimulació optogenètica *in vivo* sobre la diferenciació de les NPCs trasplantades a neurones i la disminució de l'àrea de la lesió. Així mateix, encara que els valors no tenen significància estadística, també s'observa una activació més gran de les cèl·lules de l'empelt, així com una supervivència incrementada.

Paraules clau: lesió medul·lar; optogenètica; teràpia cel·lular; progenitors neurals.

Autora:

Paula Martínez Garrido

Tutora académica:

Prof. Dra. Esther Giraldo Reboloso

Tutora externa:

Dra. Victoria Moreno Manzano

Directora experimental:

María del Mar Sánchez Martín

Localización y fecha:

Valencia, julio de 2022

AGRADECIMIENTOS

Con la entrega de este trabajo finaliza una de las etapas más importantes de mi vida tanto a nivel profesional como personal. Durante estos cuatro años he reído, llorado, disfrutado, pero sobre todo aprendido. Y todo ello no lo he hecho sola si no que acompañándome en el camino ha habido multitud de personas a las que ahora quiero agradecer todo lo que han hecho por mí.

En primer lugar, mi mayor agradecimiento va para mi familia por ser un pilar fundamental en mi vida. A mi madre por siempre estar ahí en los buenos momentos, pero sobre todo en los malos. A mi padre por demostrarme su orgullo y mi valía cuando ni yo misma soy capaz de verla. A Jorge porque en todo momento tiene unas palabras de apoyo y por ser mi guía universitario a lo largo de mi carrera. A mi hermana Helena por ver siempre el lado positivo de las cosas y hacerme reír cuando más lo necesitaba.

También quiero dar las gracias a mis amigos y amigas de la universidad porque sin ellos no hubiera llegado a este punto. Junto con ellos he disfrutado de los mejores momentos de la carrera, nos hemos apoyado mutuamente y puedo afirmar con seguridad que, aunque ahora nuestros caminos se separen, podremos contar los unos con los otros en cualquier momento.

Asimismo, me gustaría agradecer el apoyo y motivación de las supervisoras de este trabajo. Dar las gracias a Esther por atender a mis innumerables preguntas y revisar hasta el más mínimo detalle de todo lo que escribía y a María del Mar por enseñarme a moverme en el ámbito de un laboratorio y por dejar que la persiguiera a todos lados con el fin de aprender de ella. De igual forma, gracias a Vicky y a todos los integrantes del I-44 por permitirme formar parte de su equipo, ayudarme en todo lo que podían y tratarme siempre con amabilidad.

Por último, no quiero olvidarme de un profesor sin el cual no habría llegado a donde estoy: Fernando Chorro. Gracias Fernando por ayudarme con tanta dedicación a preparar la selectividad y por todas las palabras de ánimo. Siempre te recordaré como una de las personas que más han marcado mi vida estudiantil.

En conclusión, gracias a todos aquellos que me han apoyado a lo largo de esta carrera porque gracias a ellos me he convertido en la persona que hoy defiende este trabajo.

LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAV	<i>Virus adeno-asociado</i>
AAV9	<i>Virus adeno-asociado serotipo 9</i>
AMPc	<i>Adenosínmonofosfato cíclico</i>
AUC	<i>Área bajo la curva</i>
bFGF	<i>Factor de crecimiento de fibroblastos básico</i>
BSCB	<i>Barrera hematoencefálica</i>
CaMKII	<i>Proteína quinasa dependiente de calmodulina II</i>
ChABC	<i>Condroitinasa ABC</i>
ChRs	<i>Canalrodopsinas</i>
ChR2	<i>Canalrodopsina-2</i>
CSPGs	<i>Proteoglicanos de sulfato de condroitina</i>
DAG	<i>Diacilglicerol</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-fenilindol</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EGF	<i>Factor de crecimiento epitelial</i>
ESCs	<i>Células madre embrionarias</i>
FBS	<i>Suero fetal bovino</i>
FGF2	<i>Factor de crecimiento de fibroblastos 2</i>
GFAP	<i>Proteína acídica fibrilar glial</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HBSS	<i>Solución salina balanceada de Hanks</i>
HS	<i>Suero de caballo</i>
HSPGs	<i>Proteoglicanos de heparán sulfato</i>
IL- α	<i>Interleucina alfa</i>
IL- β	<i>Interleucina beta</i>
IL-6	<i>Interleucina 6</i>
iPSC	<i>Células madre pluripotentes inducidas</i>
Ip3	<i>Inositol-1,4,5-trifosfato</i>
LEDs	<i>Diodos emisores de luz</i>
LIF	<i>Factor inhibidor de la leucemia</i>
LM	<i>Lesión medular</i>

MEC	<i>Matriz extracelular</i>
MP	<i>Glucocorticoide metilprednisolona</i>
MSCs	<i>Células madre mesenquimales</i>
NgR	<i>Receptor de Nogo</i>
NG2	<i>Antígeno neuronglial 2</i>
NPCs	<i>Células progenitoras neurales</i>
NSCs	<i>Células madre neurales</i>
NT-3	<i>Neurotrofina 3</i>
OCT	<i>Tissue-Tek optimum cutting temperature</i>
OECs	<i>Células del bulbo olfatorio</i>
OMPG	<i>Glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos</i>
OPCs	<i>Células progenitoras de oligodendrocitos</i>
PBS	<i>Tampón fosfato salino</i>
PFA	<i>Paraformaldehído</i>
RNS	<i>Especies reactivas de nitrógeno</i>
ROS	<i>Especies reactivas de oxígeno</i>
SEM	<i>Error estándar de la media</i>
SEMA4D	<i>Semaforina 4D</i>
SNC	<i>Sistema nervioso central</i>
SNP	<i>Sistema nervioso periférico</i>
TNF- α	<i>Factor de necrosis tumoral alfa</i>
T8	<i>Octava vértebra torácica</i>
VGCCs	<i>Canales de voltaje dependientes de calcio</i>

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en las reacciones de inmunohistoquímica.....	18
Tabla 2. Anticuerpos secundarios empleados en las reacciones de inmunohistoquímica.....	18

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama en el que se visualizan los compartimentos de la lesión medular.....	2
Figura 2. Ilustración de la médula espinal sana y los estadios de la lesión secundaria.....	4
Figura 3. Sinergias principales entre las diferentes estrategias terapéuticas.....	7
Figura 4. Principales opsinas empleadas en optogenética.....	10
Figura 5. Imágenes de las NPCs-ChR2 formando neuroesferas.....	14
Figura 6. Esquema del sistema de optogenética empleado.....	16
Figura 7. Flujo de trabajo del ensayo in vivo.....	16
Figura 8. Esquema del corte de la médula espinal.....	17
Figura 9. Efecto de la activación de ChR2 sobre la supervivencia de las células trasplantadas transfectadas.....	20
Figura 10. Efecto de la estimulación optogenética sobre la supervivencia de las células trasplantadas totales.....	21
Figura 11. Efecto de la estimulación optogenética sobre la diferenciación de las NPCs trasplantadas a neuronas.....	23
Figura 12. Efecto de la fotoestimulación sobre la activación de las NPCs transfectadas trasplantadas	24
Figura 13. Efecto de la estimulación optogenética sobre la activación celular global.....	25
Figura 14. Efecto de la estimulación optogenética sobre la activación de neuronas endógenas.....	26
Figura 15. Efecto de la fotoestimulación sobre la preservación neuronal.....	28
Figura 16. Efecto de la estimulación optogenética de las NPCs trasplantadas sobre el área de la lesión.....	29

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Características fisiopatológicas de la lesión medular.....	1
1.2. Estrategias de tratamiento.....	5
1.3. Terapia celular en la lesión medular.....	7
1.4. Aplicación de la optogenética al tratamiento de la lesión medular.....	9
1.5. Corolario de la introducción.....	12
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. Obtención de las NPCs, cultivo, transfección y mantenimiento.....	14
3.2. Modelo de lesión medular: cirugía lesiva y tratamiento.....	15
3.2.1. Animales empleados.....	15
3.2.2. Generación de la lesión, trasplante de NPCs transfectadas con Chr2 y estimulación optogenética.....	15
3.3. Preparación del tejido.....	17
3.4. Inmunohistoquímica.....	17
3.5. Análisis de imagen.....	18
3.6. Análisis estadístico.....	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1. La estimulación optogenética <i>in vivo</i> podría tener efectos sobre la supervivencia de las células del trasplante.....	20
4.2. La estimulación optogenética <i>in vivo</i> incrementa la diferenciación de las NPCs trasplantadas a neuronas.....	22
4.3. La estimulación optogenética del trasplante celular no afecta a la activación celular de las NPCs trasplantadas ni a la activación global <i>in vivo</i>	24
4.4. La fotoestimulación <i>in vivo</i> de las células trasplantadas no afecta a la preservación de las neuronas endógenas en la lesión.....	28
4.5. La estimulación optogenética <i>in vivo</i> de las NPCs trasplantadas reduce el tamaño del área de la lesión.....	29
4.6. Limitaciones y perspectivas futuras.....	30
5. CONCLUSIONES	32
6. BIBLIOGRAFÍA	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características fisiopatológicas de la lesión medular

La médula espinal, objeto del presente trabajo, es un componente esencial del sistema nervioso central (SNC) empezando en el foramen magnum y llegando hasta la primera vértebra lumbar. Está rodeada de tres membranas meníngeas (duramadre, aracnoides y piamadre) y protegida por las vértebras de la columna. Además, el parénquima de la médula espinal está salvaguardado por la barrera hematoencefálica (BSCB, por sus siglas en inglés) (Choi et al., 2019; Ganau et al., 2019; Tripathi & Sieber, 2020). Esta estructura está constituida por materia gris (que contiene los cuerpos celulares de motoneuronas e interneuronas) rodeada de materia blanca (formada por células gliales y las fibras nerviosas de los tractos ascendentes y descendentes) delimitando la primera de ellas un región en forma de H (Cho, 2015; Choi et al., 2019; Ganau et al., 2019). A parte de las células neurales, la médula espinal también cuenta con la neuroglia propia del SNC: oligodendrocitos, astrocitos, microglía y células ependimarias (Tortora & Derrickson, 2006). Asimismo, en una médula espinal íntegra, las células están rodeadas por una matriz extracelular (MEC) compuesta por laminina, fibronectina, tenascina, proteoglicanos (proteoglicanos de sulfato de condroitina -CSPGs-, proteoglicanos de heparán sulfato -HSPGs-, etc.), hialuronano, semaforinas, factores de crecimiento y otras proteínas (Selzer et al., 2014). De hecho, la supervivencia, migración, proliferación, diferenciación, extensión de neuritas y sinaptogénesis de las células depende de la interacción entre la neuroglia y la MEC (Saremi et al., 2022).

La lesión medular (LM) es una enfermedad debilitante que da lugar a síntomas como disfunción neurológica, pérdida de independencia, disfunción de la vejiga y/o intestino, daño neuropático, etc. Puede venir causada por compresiones, laceraciones o contusiones de la médula espinal dando así lugar a un amplio espectro de consecuencias en función de la localización y severidad de dicha lesión. A nivel celular, la LM provoca una disrupción de la transducción neuronal en el espacio de la lesión derivada de la desmielinización y degeneración axonal, así como la pérdida de sinapsis (Kato et al., 2019). Asimismo, la LM puede ser completa o incompleta. Se denominará incompleta cuando todavía haya cierta conectividad a través del nivel de la lesión mientras que se describirá como completa cuando se haya perdido toda conexión a partir de dicho nivel (Courtine & Sofroniew, 2019; Sofroniew, 2018).

En el mundo la incidencia estimada de LM es de 40 nuevos casos por millón por año (Asgari et al., 2022) siendo las principales causas accidentes automovilísticos, actos violentos o caídas, aunque también puede venir ocasionada por diferentes patologías. De hecho, el creciente envejecimiento de la población está causando que cada vez haya un mayor número de pacientes de avanzada edad que se han lesionado debido a caídas accidentales. Estos individuos sufren un gran impacto en su vida personal, profesional y social y enfrentan un elevado coste económico y psicológico. Por este motivo, debido a la pronunciada incidencia, la pérdida de calidad de vida y el factor económico, surge la necesidad de investigar la fisiopatología de la LM y encontrar un tratamiento que cure o, como mínimo, disminuya los efectos negativos de la enfermedad (Fehlings et al., 2017; Kato et al., 2019; Saremi et al., 2022).

Las lesiones medulares no son homogéneas, sino que pueden dividirse en tres compartimentos (núcleo de la lesión, cicatriz astrocítica y tejido neural sano pero reactivo; Figura 1). Además, la diferente composición celular y mecanismos moleculares que tienen lugar en cada uno de dichos compartimentos influyen sobre el crecimiento axonal y la formación de nuevos circuitos:

Núcleo de la lesión. El daño celular ocasionado por el trauma provoca la aparición de restos celulares tóxicos que deben ser eliminados. Para ello, hay proliferación de fibroblastos y pericitos los cuáles se entremezclan con células sanguíneas extravasadas hasta la lesión (fibrocitos, células inmunitarias, etc.) (Burda & Sofroniew, 2014). A medida que los restos celulares son eliminados, el núcleo lesivo madura y queda compuesto por células estromales no neurales y moléculas de matriz extracelular como fibronectinas, colágenos, lamininas y proteoglicanos (Burda & Sofroniew, 2014; O'Shea et al., 2017). Otros nombres para este compartimento son cicatriz fibrótica, mesenquimal o estromal (Cajal & May, 1991; Norenberg et al., 2004).

Cicatriz astrocítica. La difusión de la inflamación se evita gracias a una estrecha cicatriz formada por astrocitos que actúan bordeando el núcleo de la lesión separándolo así del tejido neuronal sano y protegiendo este último (Burda & Sofroniew, 2014; Sofroniew, 2015). Sin embargo, a pesar de este rol protector, la cicatriz también tiene efectos negativos pues actúa como una barrera para la regeneración. Debido a su pequeño grosor, la proporción de este compartimento respecto al anterior es pequeña (Sofroniew, 2015). Además, en este espacio también encontramos células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs) reactivas cuyo papel no está bien definido por el momento (O'Shea et al., 2017).

Tejido neural sano pero reactivo. Seguidamente a la cicatriz astrocítica se encuentra un compartimento de tejido neural sano pero reactivo el cual contiene todos los elementos celulares requeridos para la función del SNC (Burda & Sofroniew, 2014; Courtine & Sofroniew, 2019; O'Shea et al., 2017; Sofroniew, 2018).

El evento traumático inicial da lugar a la lesión primaria causada por compresión, contusión, estiramiento o retorcimiento de la médula espinal. De este modo, las neuronas, los oligodendrocitos y otros componentes necesarios para la transmisión neuronal son dañados (Wilcox et al., 2017), así como los componentes vasculares incluyendo la BSCB y derivando este suceso en la infiltración de células inflamatorias. La lesión secundaria se refiere a los procesos patológicos que se inician tras la lesión primaria y que pueden tener una duración de semanas. En esta fase de la patología se generan daños físicos y químicos como el incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en el interior de la célula lo cual provoca deterioro en los componentes celulares ocasionando pérdida celular y, por consiguiente, disfunción neurológica. Otras consecuencias de la lesión secundaria son las señales proapoptóticas, el incremento de la permeabilidad de las células, la isquemia y rotura de la BSCB, hemorragia e infiltración de células inmunitarias que liberarán citoquinas inflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) interleucina alfa (IL- α), interleucina beta (IL- β) e interleucina 6 (IL-6). Todo ello agrava la lesión primaria provocando un empeoramiento de la sintomatología. En este ambiente, las neuronas, oligodendrocitos y astrocitos cercanos a la lesión quedan sometidos a procesos de apoptosis, necrosis u otros mecanismos de muerte celular produciendo así degeneración axonal anterógrada (degeneración Walleriana) y retrógrada. Asimismo, los astrocitos reactivos (aquellos con un fenotipo proinflamatorio y que constituyen la cicatriz astrocítica tras la LM) y otras células gliales secretan CSPGs los cuales actúan como una barrera física y química que impide la regeneración endógena del tejido (Katoh et al., 2019).

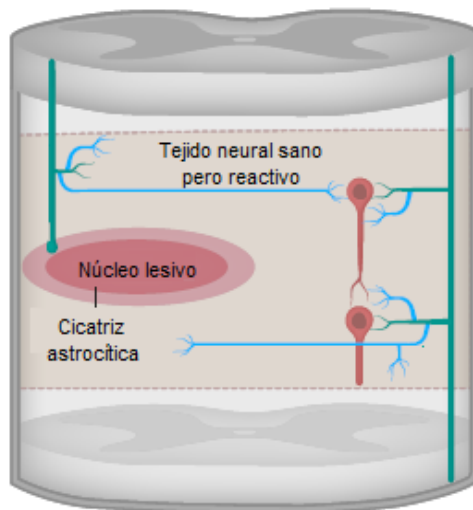


Figura 1. Diagrama en el que se visualizan los compartimentos de la lesión medular. El núcleo no neural de la lesión se halla rodeado por una cicatriz astrocítica que lo separa del tejido neural sano pero reactivo evitando así la extensión del trauma. Imagen obtenida de Sofroniew, 2018.

Los procesos que tienen lugar en la médula dañada durante la lesión secundaria pueden dividirse en diferentes fases según el tiempo que haya pasado desde el inicio de la lesión (Figura 2): aguda (<48 horas), subaguda (48 horas-14 días), intermedia (14 días- 3 meses) y crónica (>3 meses) (Katoh et al., 2019; Saremi et al., 2022):

Fase aguda (<48 horas). Se inicia tras la producción del trauma inicial derivando en desequilibrios iónicos, excitotoxicidad (acumulación de neurotransmisores), formación de radicales libres, inflamación, influjo de calcio, necrosis celular y edema (Alizadeh et al., 2019; Ko, 2019; Venkatesh et al., 2019). Además, se incrementa la permeabilidad de la BSCB promoviendo el influjo de leucocitos, fluido y proteínas favoreciendo así el edema (Venkatesh et al., 2019). De igual forma, también tienen lugar procesos de hemorragia e isquemia provocando esta última exacerbamiento de la muerte celular lo cual, a su vez, inicia una serie de procesos inflamatorios como la activación de la microglía, reclutamiento de células inmunitarias y la liberación de citoquinas (TNF- α , IL- β , IL-6, factor inhibidor de la leucemia -LIF-, etc.) (Donnelly & Popovich, 2008; Pineau & Lacroix, 2007). Seguidamente, el exceso de calcio acumulado activa proteinasas, cisteinproteasas y fosfolipasas y promueve la disfunción mitocondrial, degradación proteica y, finalmente, daño oxidativo (Alizadeh et al., 2019; Couillard-Despres et al., 2017). También se observa muerte neuronal debido a la producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Bao & Liu, 2002; Saremi et al., 2022; Schmidley, 1990; Xu et al., 2005).

Fase subaguda (48 horas-14 días). Se caracteriza por una infiltración leucocitaria máxima, respuestas fagocíticas y la proliferación de astrocitos que presentarán un fenotipo reactivo (Rowland et al., 2008). En esta etapa se forman las cicatrices gliales (gliosis) que reconstruyen la BSCB dañada, limitan la infiltración de células inmunitarias y reestablecen el desequilibrio iónico, pero también evitan la regeneración axonal constituyendo una barrera y expresando componentes inhibitorios como los CSPGs (Karimi-Abdolrezaee & Billakanti, 2012; Saremi et al., 2022).

Fase intermedia (14 días- 3 meses). En esta fase tiene lugar la maduración de la cicatriz astrocítica seguida por una posible reinervación mediante *sprouting* axonal (Hill et al., 2001; Rowland et al., 2008; Saremi et al., 2022).

Fase crónica (>3 meses). Madura la lesión y se forma una cavidad rodeada de tejido conectivo y llena de líquido cefalorraquídeo (cavidad quística). Es en este momento también cuando se producen los eventos de degeneración Walleriana, desmielinización, apoptosis y estrés oxidativo (Dulin et al., 2013; Oyinbo, 2011; Rowland et al., 2008).

Respecto a la regeneración de la lesión, en el sistema nervioso periférico (SNP) los axones pueden generarse nuevamente estableciendo nuevas conexiones lo cual no ocurre en el SNC adulto (Sofroniew, 2018). Para regenerar o mejorar la situación de la LM se estudia reparar las conexiones neuronales perdidas potenciando la capacidad endógena de *sprouting* y otras formas de remodelación sináptica, así como la remielinización e inhibiendo aquellos factores que afectan negativamente a estos procesos de recuperación. Entre estos factores encontramos la cicatriz glial, los CSPGs, la reacción inflamatoria y la siringomielia cuyos detalles se exponen a continuación:

Cicatriz glial. Tras la LM los astrocitos sufren un cambio fenotípico conocido como gliosis reactiva proliferando y organizándose en torno a la lesión y generando así la cicatriz astrocítica. Esta cicatriz constituye uno de los principales impedimentos para la regeneración axonal pues actúa como una barrera física. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, también tiene efectos beneficiosos sobre la reparación del SNC pues bloquea la expansión de la lesión. De hecho, la completa ablación de los astrocitos origina consecuencias negativas en los pacientes con lesión medular. Por consiguiente, las investigaciones deben centrarse en encontrar una terapia que potencie el rol beneficioso de los astrocitos a la vez que minimiza los efectos deletéreos (Katoh et al., 2019).

CSPGs. Son glicoproteínas de la matriz extracelular que actúan como inhibidores del crecimiento axonal y que incluyen neurocano, versicano, brevicano, fosfacano y antígeno neuronglial 2 (NG2). Son ampliamente expresados en el SNC sirviendo como señales guía durante el desarrollo y actuando como moduladores de las conexiones sinápticas en adultos. Tras la lesión, los astrocitos y otros tipos celulares secretan CSPGs convirtiéndose estos en una barrera para la regeneración axonal (Bartus et al., 2014; Bradbury & Carter, 2011; Katoh et al., 2019).

Reacción inflamatoria. La intensa inflamación local da lugar a la activación de la microglía y facilita la infiltración de macrófagos en la lesión los cuales pueden presentar un fenotipo proinflamatorio (M1) o antiinflamatorio (M2). Debido a su efecto negativo sobre la regeneración medular, múltiples estrategias terapéuticas van dirigidas a disminuir o evitar este proceso inflamatorio (Katoh et al., 2019).

Siringomielia. La muerte y degeneración celular promueve la pérdida de tejido parenquimático en el epicentro de la lesión y origina la formación de cavidades quísticas (proceso que se conoce como siringomielia). Estas cavidades contienen líquido cefalorraquídeo, bandas de tejido conectivo y monocitos/macrófagos infiltrados. La acumulación de líquido cefalorraquídeo en dicha cavidad impide la regeneración y, además, la presión ejercida por el mismo provoca un aumento del tamaño de la lesión (Katoh et al., 2019).

En general, en relación con el fallo en la regeneración axonal en el SNC, se podría concluir que se debe a la presencia de sustancias inhibitoras en el tejido sano (CSPGs, glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos -OMPG-, semaforina 4D -SEMA4D-, Nogo, receptor de Nogo -NgR-, etc.) y a la falta de moléculas quimioatrayentes en la lesión (Sofroniew, 2018). Por tanto, las estrategias destinadas a pacientes con LM irán dirigidas a conseguir un ambiente favorecedor para la regeneración axonal y/o bloquear los mecanismos inhibitorios.

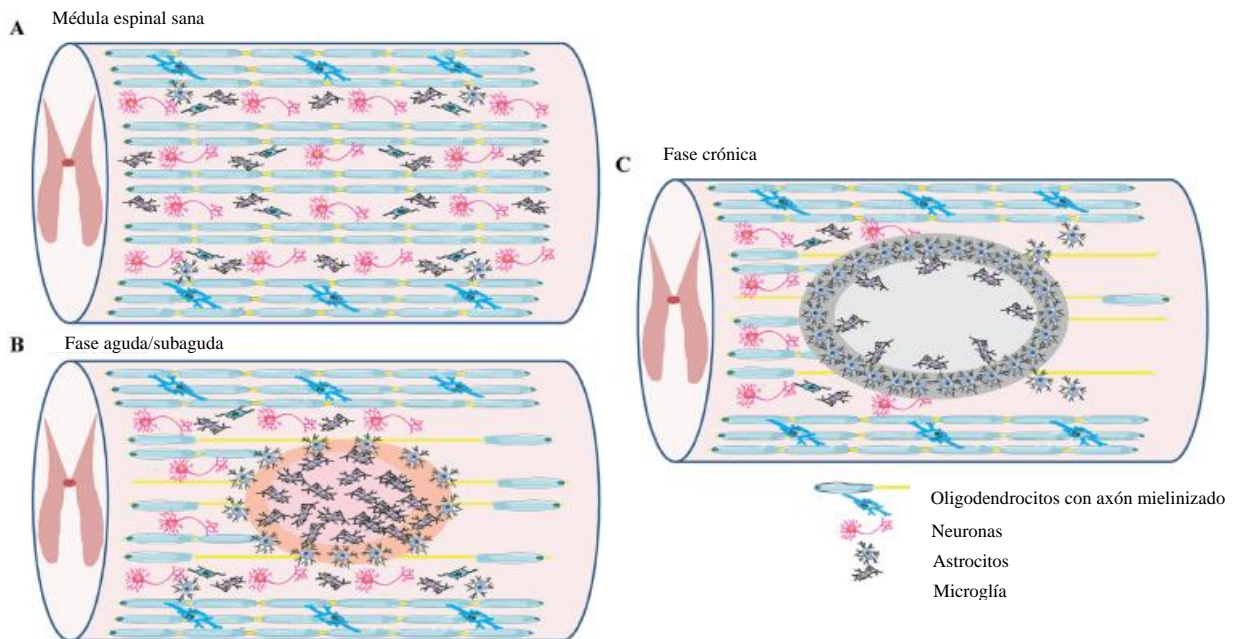


Figura 2. Ilustración de la médula espinal sana y los estadios de la lesión secundaria. A) Médula espinal sana, B) Fase aguda/subaguda; En la fase aguda tiene lugar una serie de procesos inflamatorios tales como la activación de la microglía y el reclutamiento de las células inmunitarias al lugar de la lesión. En la fase subaguda, hay una infiltración de macrófagos, fagocitosis y un proceso de gliosis reactiva que dará lugar a la cicatriz glial. C) Fase crónica; Esta fase se caracteriza por la expansión de la lesión y la formación de la cavidad quística. Imagen obtenida de Saremi et al., 2022.

1.2. Estrategias de tratamiento

En las últimas décadas se han hecho avances significativos en el tratamiento de la LM, pero todavía no se cuenta con un método práctico y reproducible para mejorar la parálisis causada por dicha lesión. Aunque, las terapias actuales como fármacos neuroprotectores, trasplantes celulares y otras estrategias para favorecer la remielinización, regeneración axonal y plasticidad neuronal están demostrando mejoras significativas en modelos animales de lesión medular (menor inflamación, cavidad quística más pequeña, mayor crecimiento axonal, etc.) dichos resultados no consiguen trasladarse a la clínica pues fallan al aplicarlos en seres humanos (Badhiwala et al., 2019). Este hecho, en el caso de modelos roedores, seguramente se deba a las diferencias existentes respecto a la recuperación espontánea de la lesión y la anatomía de la médula espinal.

Sin embargo, si bien la cura permanece todavía fuera de nuestro alcance, durante los últimos años se ha mejorado con creces nuestro conocimiento sobre la enfermedad y los posibles obstáculos que enfrenta la regeneración neuronal. Este mayor entendimiento nos acerca cada vez más al desarrollo de una terapia práctica y efectiva que permita mejoras en la vida de los pacientes con LM (Katoh et al., 2019). En este apartado nos dedicaremos a describir las estrategias principales actuales para el tratamiento de dicha patología:

Estrategias clásicas. Por el momento, los tratamientos para la lesión medular que se aplican en la clínica se basan en procedimientos de estabilización de la médula espinal, cirugía de descompresión, mantenimiento del flujo sanguíneo para reducir los efectos de la isquemia, rehabilitación y otras terapias preventivas que permiten que dicha lesión no se exacerbe (Courtine & Sofroniew, 2019; Saremi et al., 2022).

Fármacos y biomoléculas. Los fármacos empleados para el tratamiento de la LM pueden tener múltiples dianas como, por ejemplo, los procesos inflamatorios, en este caso, dado que la inflamación también tiene efectos beneficiosos sobre la lesión, es importante modular adecuadamente dichos medicamentos. También se ha estudiado como posibles dianas terapéuticas las vías involucradas en la muerte celular. De hecho, una de las opciones más evaluadas es la inhibición de la caspasa-3 relacionada con los mecanismos de apoptosis. Sin embargo, los procesos que llevan a cabo la muerte celular parecen estar interconectados y ser complementarios por lo que una vía menor pasa a ser dominante cuando la principal es inhibida (Katoh et al., 2019). Asimismo, la depleción de macrófagos infiltrados en la lesión o su modificación a un fenotipo antiinflamatorio (M2) reduce la regeneración retrógrada de los axones tras el trauma (Evans et al., 2014). Otro enfoque sería la degradación de CSPGs mediante condroitinasa ABC (ChABC) lo cual permite romper la barrera inhibitoria y promover la reparación endógena. Aun así, dicha terapia también cuenta con desventajas que deben mejorarse como la baja estabilidad térmica y la vida media corta de la ChABC que hace necesario suministrarla de forma continua. A esto se le suma los problemas de seguridad e inmunogenicidad debido a su origen bacteriano (Bartus et al., 2014; Bradbury & Carter, 2011; Katoh et al., 2019). Del mismo modo, el suministro de factores de crecimiento en la médula espinal podría favorecer la proliferación y diferenciación de células endógenas. Por ejemplo, uno de los tratamientos planteados es la inyección de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epitelial (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) en el canal central de la médula para incrementar la proliferación de células ependimarias y favorecer la recuperación funcional tras la lesión (Katoh et al., 2019). A pesar de todos los enfoques descritos (y otros muchos existentes), hasta el momento, el único fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de la LM es el glucocorticoide metilprednisolona (MP) el cual reduce la inflamación y la peroxidación lipídica en las primeras horas de la lesión, aunque cuenta con múltiples efectos secundarios (Saremi et al., 2022).

Exosomas. Los exosomas son vesículas con doble membrana de entre 30 y 150 nm de diámetro que contienen DNA, RNA, proteínas y lípidos. El rol de estas pequeñas estructuras consiste en transportar información entre células tanto en estados fisiológicos como patológicos.

De hecho, se ha observado que exosomas derivados de células madre mesenquimales pueden ejercer una acción neuroprotectora, regenerativa, antiinflamatoria e inmunomoduladora en afecciones nerviosas (Galieva et al., 2019; Qiu et al., 2019). Además, los exosomas son fácilmente producibles y esterilizables y no presentan una acción tumorigénica al no contener células. De igual forma, su pequeño tamaño les aporta la capacidad de traspasar la BSCB para alcanzar la lesión (Saremi et al., 2022).

Biomateriales. Empezaron a utilizarse como estructuras para puentear la zona de la lesión y permitir el crecimiento axonal a través de la misma, pero han evolucionado permitiendo la secreción de factores que favorecen el crecimiento tisular y la vascularización, la liberación de fármacos o actuando como vehículo para el trasplante de células en la lesión. Se han desarrollado múltiples estructuras para su aplicación en la LM: polímeros naturales, polímeros biodegradables o polímeros sintéticos no biodegradables. Los polímeros naturales son biodegradables, presentan sitios de unión naturales para las células y, generalmente, provocan menor inflamación y respuesta inmunitaria. Por otra parte, los materiales sintéticos permiten una mejor consistencia del producto y características ajustables. En definitiva, cada sustrato tiene sus ventajas e inconvenientes y no hay consenso acerca de la mejor elección. El *scaffold* ideal tendría un diseño simple que permitiera una fácil fabricación, una buena biocompatibilidad con baja inmunogenicidad, propiedades mecánicas que facilitarían la adhesión celular y la regeneración axonal y sería fácil de trasplantar, así como biodegradable (Courtine & Sofroniew, 2019; Katoh et al., 2019).

Injertos tisulares. Otro abordaje para el tratamiento de la LM es el trasplante de autoinjertos o aloinjertos del SNP, así como de aloinjertos y xenoinjertos de médula espinal. Sin embargo, esta terapia tiene múltiples limitaciones como, por ejemplo, la necesidad de eliminar tejido de alguna parte del organismo con el objetivo de llevar a cabo el autotrasplante. A esto se le suma el riesgo de transmisión de enfermedades e inmunogenicidad en aloinjertos y xenoinjertos lo que deriva en la necesidad de suministrar medicación inmunosupresora. Además, esta terapia parece fallar en la integración sensitivo-motora entre huésped, injerto y cerebro (Saremi et al., 2022).

Tratamiento celular. Esta estrategia terapéutica se describirá más adelante por lo que en este apartado nos vamos a limitar a nombrarla para que quede constancia de que es uno de los principales abordajes para el tratamiento de la lesión medular en la actualidad.

Terapias combinadas. Las terapias combinadas consisten en aunar dos o más de las estrategias anteriores permitiendo así desarrollar metodologías neuroprotectoras y neuroregeneradoras de la médula espinal (Saremi et al., 2022). Como ejemplo de ello se propone la combinación de células madre neurales con agentes farmacológicos como la ChABC lo cual se ha observado que es capaz de mitigar el efecto inhibitorio de los CSPGs en la migración de las células trasplantadas estimulando así la regeneración neuronal tras el trauma (Ikegami et al., 2005).

Además de conseguir la regeneración, también es importante contar con un método que permita evaluar la recuperación de las conexiones neuronales, motivo por el que surgieron los trazadores neuronales. Para su utilización, ayudados de un aparato estereotáctico, el trazador es inyectado en el cerebro para un transporte anterógrado y en órganos periféricos o segmentos espinales para un transporte retrógrado. Tras un periodo específico, las regiones delimitadas por los trazadores podrán evaluarse en secciones histológicas permitiendo visualizar la morfología y tracto axonal de un grupo concreto de neuronas. Los virus neurotrópicos son ampliamente utilizados como trazadores gracias a su habilidad de trasladarse entre neuronas interconectadas y autorreplicarse permitiendo así la amplificación de la señal (Katoh et al., 2019). Aun así, también cuentan con desventajas como la toxicidad vírica sobre las neuronas del huésped. Otra técnica que ha ido ganando interés para la evaluación de la regeneración neural es el clarificado (Tomer et al., 2014) que consiste en un método químico que transforma tejido biológico en un híbrido

transparente tejido-hidrogeles pudiendo así visualizarse con elevada precisión conexiones neurales en combinación con trazadores virales. De igual forma, también puede estudiarse la conectividad neuronal de forma no invasiva mediante electromiogramas o resonancia magnética (Kato et al., 2019).

En conclusión, las investigaciones deberían centrarse en encontrar la mejor combinación de terapias con el fin de conseguir la regeneración medular teniendo en cuenta factores externos como la dieta que puedan causar variaciones en los resultados del estudio. Asimismo, además de la búsqueda de la sinergia adecuada (Figura 3), también se presentan otros retos como definir el orden de suministro, decidir entre su administración continua o en una sola dosis o determinar si existen interferencias entre las dianas sobre las que actúan (Saremi et al., 2022). Por tanto, aunque hasta el momento sea la estrategia más valorada, su desarrollo es complejo y presenta múltiples incógnitas que resolver.

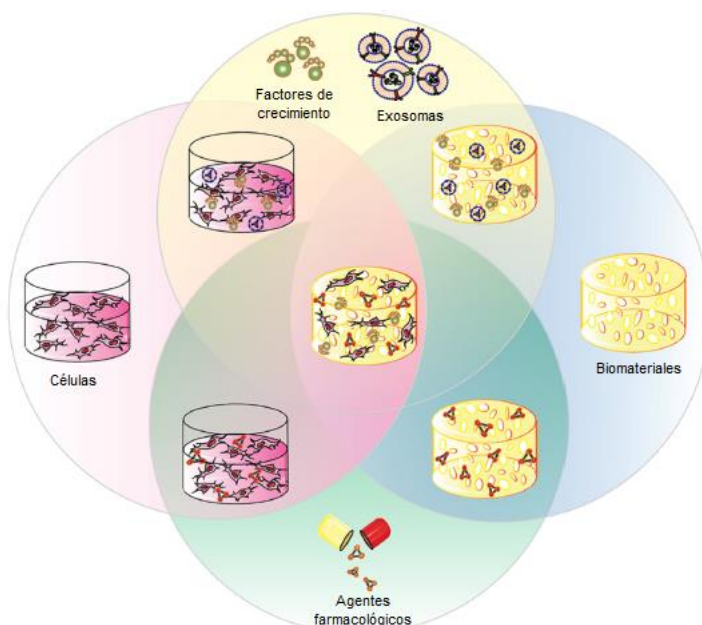


Figura 3. Sinergias principales entre las diferentes estrategias terapéuticas. Por el momento, las terapias combinadas se postulan como el camino a seguir, aunque son numerosos los retos que presentan y las incógnitas a investigar. Imagen obtenida de Saremi et al., 2022.

1.3. Terapia celular en la lesión medular

El tratamiento celular es una de las estrategias más prometedoras hasta el momento y se basa en dos enfoques distintos: trasplantar células exógenas para regenerar o implementar un ambiente favorecedor o promover la función de células progenitoras endógenas. De hecho, la terapia celular tiene multitud de efectos positivos sobre los pacientes con LM: regula la respuesta inmunitaria, reemplaza las neuronas perdidas tras el trauma y aporta factores neurotróficos y componentes de la MEC favoreciendo así la regeneración neuronal (Saremi et al., 2022).

A consecuencia de la pérdida de células tras la lesión, el enfoque más empleado, especialmente en la LM completa y severa, es el trasplante de células para repoblar dicho espacio. Las células del injerto no solo sirven para la repoblación de la médula espinal, sino que también transforman el espacio en un lugar más favorecedor que previene la desmielinización y apoptosis de las células neurales. Este trasplante puede realizarse con varios tipos celulares: células madre neurales (NSCs), células madre embrionarias (ESCs), células madre mesenquimales (MSCs), células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), OPCs, células progenitoras endoteliales, células del bulbo olfatorio (OECs), células de Schwann, queratinocitos, células del epitelio amniótico,

mastocitos, células mononucleares, linfocitos T e incluso células modificadas genéticamente (Przekora & Juskiewicz, 2020; Ryabov et al., 2020; Saremi et al., 2022):

Células madre neurales. De entre todos los tipos celulares las más utilizadas son las células madre neurales que se diferencian en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos y secretan factores neurotróficos que reducen la inflamación, degradan los CSPGs y promueven la reparación endógena de tejidos. Además, los oligodendrocitos diferenciados remielinizan los axones desnudos, las neuronas injertadas forman nuevos circuitos neurales restaurando así la conectividad de la médula espinal y permiten la infiltración de macrófagos M2 en el lugar de la lesión. Aun así, es importante tener en cuenta que estas células tienen identidad cortico-cerebral por lo que no acaban de adaptarse al ambiente de la médula espinal. (Curt et al., 2019; Katoh et al., 2019; Saremi et al., 2022; Tsuji et al., 2019).

OPCs y células de Schwann. De igual forma, otra estrategia sería emplear directamente OPCs las cuales favorecen la remielinización y secretan factores neurotróficos que disminuyen la inflamación y promueven la regeneración axonal. Asimismo, también se ha visto que las células de Schwann migran a la médula espinal apoyando la remielinización tras la lesión. Por tanto, también se plantea su injerto puesto que son más fáciles de recolectar y cultivar que las OPCs (Anderson et al., 2017).

Células olfatorias. Son células gliales que comparten ciertas características con los astrocitos y las células de Schwann y que podemos encontrar tanto en el SNP (mucosa olfatoria) como en el SNC (bulbo olfatorio). Estas células son capaces de fagocitar restos celulares, modular la inflamación, secretar factores neurotróficos, promover la angiogénesis, guiar la elongación axonal y producir elementos de la MEC que actúen como andamiaje para el crecimiento axonal. Además, se ha visto que, tras su administración intravenosa, son capaces de alcanzar el lugar de la lesión disminuyendo la inflamación y promoviendo la remielinización y la recuperación de la función motora (L. Zhang et al., 2019).

Células madre mesenquimales. son células multipotentes que pueden extraerse de tejidos como el adiposo, la médula ósea, la pulpa dental, la gelatina de Wharton o el endometrio. Su administración promueve la recuperación funcional de la médula dañada pues deriva en mecanismos de remielinización, regeneración axonal, inhibición de la apoptosis y el inflamósoma, y cambio a un fenotipo antiinflamatorio por parte de los macrófagos. Entre sus diferentes orígenes, las más empleadas en estudios recientes son aquellas derivadas del endometrio ya que tienen una mayor capacidad de diferenciarse en motoneuronas que otros tipos (Bonilla et al., 2021; Shirian et al., 2016).

Células madre pluripotentes inducidas. tal como su nombre indica son células proliferativas pluripotentes que derivan de células somáticas diferenciadas mediante reprogramación genética (mecanismo descubierto por Yamanaka en 2006). A diferencia de las células madre pluripotentes embrionarias, estas no tienen una problemática ética, aunque sí que preocupa su posible inducción de la tumorigénesis. Respecto a su aplicación en la lesión medular, las neuronas formadas a partir de estas células son capaces de integrarse y formar sinapsis con las células neurales del huésped. Asimismo, producen agentes neuroprotectores y promueven la angiogénesis y la remielinización favoreciendo así la recuperación funcional (Bonilla et al., 2021; Saremi et al., 2022).

Células modificadas. Las células modificadas pueden ver incrementada su expresión de genes neuroprotectores y estimular la regeneración en el lugar de la lesión. Son ejemplos de este enfoque células mesenquimales de cordón umbilical modificadas para sobreexpresar neurotrofina 3 (NT-3) las cuales se ha visto que confieren protección frente a la desmielinización, reducen la cavidad quística y promueven la recuperación funcional (Shang et al., 2011). Otro ejemplo sería la modificación de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo para la inhibición de PTEN (gen supresor tumoral) y la sobreexpresión de ChABC favoreciendo así la recuperación motora en pacientes con lesión medular (T. Lu et al., 2020).

En nuestro caso, las células empleadas constituyen progenitores neurales (NPCs) puesto que se han postulado como uno de los principales tipos celulares a trasplantar gracias a sus numerosas ventajas terapéuticas. Por una parte, se ha observado en modelos animales que las neuronas generadas a partir de las NPCs son capaces de integrarse anatómicamente y funcionalmente en los circuitos neurales del huésped y promover la formación de nuevas conexiones a través de la lesión (Adler et al., 2017; Bonner et al., 2011; Dougherty et al., 2016; Koffler et al., 2019; Lee et al., 2014; P. Lu et al., 2012; Spruance et al., 2018; White et al., 2010; Yokota et al., 2015; Zholudeva et al., 2018). Por otra parte, las células gliales derivadas del trasplante aportan soporte a las nuevas neuronas generadas, favorecen la regeneración, extensión y remielinización de los axones dañados y atenúan la formación de la cicatriz glial (Houlé & Reier, 1988; Kadoya et al., 2016; Reier et al., 1986). Estas células pueden obtenerse de la médula espinal de mamíferos en desarrollo, así como a partir de iPSCs o ESCs (Fischer et al., 2020).

A pesar de las numerosas ventajas de la terapia celular cabe destacar que esta también cuenta con inconvenientes como la pobre supervivencia celular y la limitada diferenciación. Para abordar esta serie de limitaciones se han usado múltiples estrategias tanto de forma individual como combinada: cócteles de factores de crecimiento, andamios de biomateriales y fármacos que promueven la supervivencia o diferenciación celular (Giraldo et al., 2021). En el presente trabajo, y tal como se describirá en el siguiente apartado, se emplea la optogenética como método para potenciar las cualidades terapéuticas de las células trasplantadas.

1.4. Aplicación de la optogenética al tratamiento de la lesión medular

Los animales vertebrados presentan un sistema nervioso amplio, complejo y altamente variable. Es por ello por lo que las tecnologías clásicas empleadas en neurobiología presentan ciertas limitaciones. Por ejemplo, las lesiones intracraneales y la estimulación eléctrica afectan a áreas concretas del SNC, pero no restringen esta acción a un tipo particular de neuronas. Asimismo, la farmacología dirigida o la manipulación transgénica mediante vectores virales presentan una baja resolución temporal. Todos estos inconvenientes son solucionados con la aplicación de la optogenética a las investigaciones neurológicas (Guru et al., 2015).

La optogenética es una tecnología novedosa que combina métodos ópticos y genéticos para el preciso control espacial y temporal de poblaciones celulares específicas (Giraldo et al., 2021; Guru et al., 2015; Kathe et al., 2022). Para ejercer este control sobre la población celular, las células deben ser modificadas genéticamente para expresar una opsina sensible a la luz. Dicha opsina suele constituir un canal iónico, una bomba o un receptor acoplado a proteínas G. De esta forma, cuando las células modificadas son irradiadas con una determinada longitud de onda se producen cambios conformacionales que provocan la apertura del canal o la activación de la bomba derivando este suceso en la despolarización o hiperpolarización celular y, por consiguiente, en la activación o el silenciamiento de las neuronas (Guru et al., 2015).

Esta metodología fue utilizada por primera vez hace casi dos décadas por Boyden et al. (2005) y, hasta el momento, ha sido ampliamente desarrollada obteniéndose diferentes tipos de proteínas fotosensibles y sistemas de fotoestimulación. La optogenética presenta tres componentes esenciales (Ordaz et al., 2017):

Proteínas fotosensibles. Son proteínas transmembrana que modifican la actividad de la célula en la cual son expresadas cuando hay una exposición a luz de una determinada frecuencia. Estas moléculas pueden emplearse para generar potenciales de acción, suprimir la actividad neural o modificar vías bioquímicas de señalización. Las proteínas más ampliamente utilizadas para desempeñar esta función son las opsinas. Las opsinas pueden modificarse para mejorar sus funciones o emplearse tal como se encuentran en la naturaleza. Estas proteínas en su forma natural pueden dividirse en dos categorías: Tipo I (opsinas microbianas) o Tipo II (opsinas de vertebrados). Las opsinas microbianas constituyen bombas o canales mientras que las obtenidas

de vertebrados son receptores acoplados a proteínas G y suelen producir cambios más lentos en respuesta a la luz que las de tipo I (Figura 4). Por este motivo, debido a su cinética más rápida y su facilidad de modificación, las opsinas de tipo I son las más utilizadas en los experimentos de optogenética tanto en su forma natural como transformadas mediante ingeniería genética.

Para su correcto funcionamiento, ambos tipo de opsinas requieren de retinal el cual al unirse a las mismas les aporta la fotosensibilidad. De esta forma, si un fotón impacta en el retinal se produce su fotoisomerización dando así lugar a un cambio conformacional en la opsina y, por ende, a la activación o inhibición de la neurona que la expresa ectópicamente o la modificación de una vía biológica intracelular. De hecho, a parte de su clasificación en la naturaleza, basándose en sus efectos sobre la célula, las opsinas pueden dividirse en tres tipos: opsinas excitatorias, inhibitorias y moduladoras de cascadas de señalización intracelulares. Las opsinas excitatorias (p.e. canalrodopsinas) son canales de cationes que inducen la despolarización celular al ser irradiadas con luz mientras que las inhibitorias (p.e. canales de cloro, bombas de cloro o bombas de protones) provocan una hiperpolarización de la célula y, por ende, su silenciamiento. Por otra parte, las opsinas que modulan las vías de señalización intracelulares lo hacen mediante su acción sobre segundos mensajeros (adenosínmonofosfato cíclico -AMPC-, inositol-1,4,5-trifosfato -Ip3-, diacilglicerol -DAG-, etc.). También pueden emplearse otro tipo de proteínas fotosensibles como los criptocromos y fitocromos de origen vegetal (Guru et al., 2015; Tischer & Weiner, 2014).

En el presente trabajo nos vamos a centrar en un tipo de proteínas fotosensibles conocidas como canalrodopsinas (ChRs). Las ChRs son canales iónicos sensibles a la luz descubiertos en el alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*. A su vez, dentro de este grupo encontramos la canalrodopsina-2 (ChR2), un canal fotosensible no específico de cationes que cuando es iluminado con luz azul se abre permitiendo el paso de iones cargados positivamente y, por consiguiente, la despolarización celular (Guru et al., 2015; Ordaz et al., 2017). Además, esta proteína ha sido modificada en numerosas ocasiones para optimizar su expresión. En nuestro caso, la mutación sin sentido H134R (hChR2) permite una mayor corriente de cationes incrementando así el grado de despolarización de la célula (Toettcher et al., 2013). Asimismo, también se han desarrollado proteínas con otras características de interés como opsinas con cinéticas más rápidas, mayor sensibilidad a la luz o que absorban a longitudes de onda distintas (Guru et al., 2015).

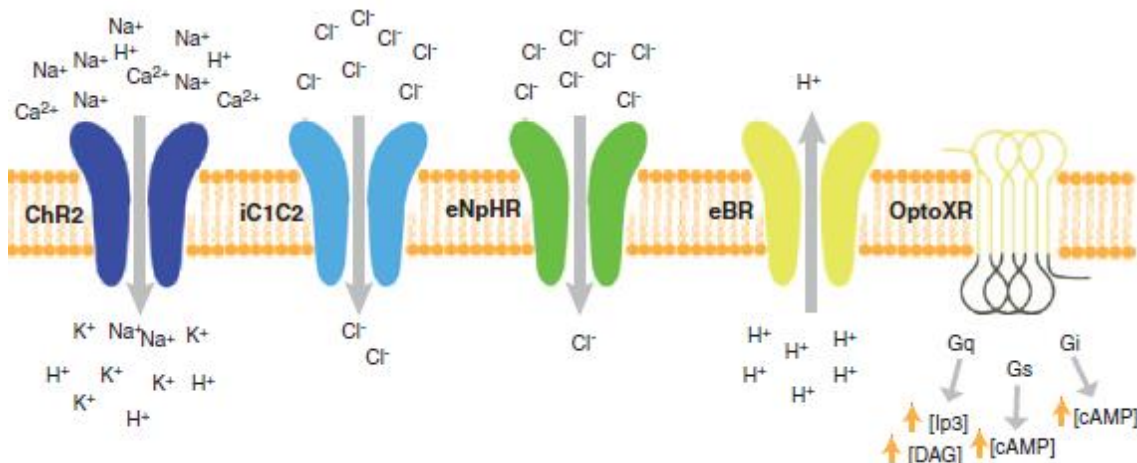


Figura 4. Principales opsinas empleadas en optogenética. Las canalrodopsinas (p.e. ChR2) son opsinas excitatorias puesto que al activarse con luz provocan la despolarización de la célula. A diferencia de las anteriores, los canales de cloro (p.e. iC1C2), bombas de cloro (p.e. eNpHR) y bombas de protones (p.e. eBR) son opsinas inhibitorias ya que al incidir la luz sobre las mismas tiene lugar un mecanismo de hiperpolarización de la célula en la que se expresan. Por último, las opsinas de vertebrados han sido modificadas para dar lugar a la familia OptoXR la cual se emplea para modular cascadas de señalización intracelular mediante el control de segundos mensajeros. Imagen obtenida de Guru et al., 2015.

Sistemas de expresión ectópica de proteínas. La expresión ectópica de proteínas puede ser conseguida de múltiples formas. Uno de los métodos más empleados es a través de vectores virales mediante transducción. Según este enfoque, un virus modificado para expresar un gen que codifica para una opsina precedido de un promotor específico es inyectado en la región de interés del cerebro o empleado para transformar un determinado cultivo celular que después se trasplantará en el tejido nervioso. Los tipos de partículas virales que pueden emplearse son extensos: lentivirus, virus adenoasociados, virus de la rabia, adenovirus canino y virus del herpes simple (F. Zhang et al., 2010; Zhu, 2009). Sin embargo, la carga genética que pueden soportar estos virus es pequeña por lo que el tamaño del promotor queda limitado. Esta limitación puede solucionarse empleando animales transgénicos o knock-in que expresen la opsina en una determinada población neural. De hecho, múltiples líneas de animales han sido creadas para expresar ChR2 en numerosos tipos celulares (Zhao et al., 2011). No obstante, este método conlleva un mayor tiempo y esfuerzo para generar una línea transgénica estable y la precisión espacial conseguida con el vector viral se pierde. Además, debería crearse una nueva línea cada vez que se quisiera emplear una nueva opsina. Otra estrategia son las líneas de ratones que expresan la recombinasa Cre en combinación con vectores virales. Esta recombinasa es una enzima que cataliza la recombinación entre dos sitios loxP que flaquean el material genético de interés sólo viéndose afectado el mismo cuando dicha enzima está presente. Para llevar a cabo este método se emplea un vector viral que contiene el gen que codifica para la opsina invertido y entre dos sitios loxP. De esta forma, cuando el gen es liberado en una región concreta del sistema nervioso en la que se expresa la recombinasa Cre en una determinada población celular dicho material genético será invertido y por tanto expresado en ese subtipo celular (Fenno et al., 2014).

En nuestro caso, se emplea ChR2-mCherry transducida en progenitores neurales (NPCs) mediante un virus adenoasociado (AAV). Se ha empleado este tipo de virus porque presenta una baja inmunogenicidad y no hay constancia de patologías asociadas, provee un amplio tropismo tisular y es más seguro que los lentivirus ya que normalmente no se integra en el genoma del huésped. En contraposición a sus ventajas, tiene una capacidad pequeña (4,7kb) limitando así el uso de ciertos promotores. Más concretamente, se ha seleccionado el serotipo 9 (AAV9) ya que se ha visto que es el que tiene mayor tropismo para el SNC (Kantor et al., 2014).

Sistemas de fotoestimulación. En la actualidad se emplean dos sistemas principales de fotoestimulación: las fuentes láser y los diodos emisores de luz (LEDs). Por una parte, las fuentes láser permiten irradiar las células con una longitud de onda muy precisa y pueden acoplarse de forma eficiente a fibras ópticas. Por otra parte, los LEDs, sistema empleado en el presente trabajo, constituyen una opción atractiva debido a su bajo coste, pequeño tamaño y amplia variedad de longitudes de onda. No obstante, también cuentan con limitaciones como la generación de calor en el tejido que está siendo irradiado (Warden et al., 2014).

Esta tecnología no se limita únicamente a estudios sobre la LM si no que se aplica en numerosas investigaciones científicas. En efecto, se ha observado su capacidad para mejorar las cualidades terapéuticas de células trasplantadas tras un accidente cerebrovascular (Yu et al., 2019) o su importante papel en los tratamientos de estimulación del nervio vago (Goggins et al., 2022). De igual forma, también se emplea fuera del campo de la neurociencia como herramienta terapéutica. Por ejemplo, se ha estudiado su utilización para la restauración de la visión y la respuesta retinal en perros ciegos (Nikonov et al., 2022) o su aplicación para atenuar la pérdida de oído en humanos (Ajay et al., 2022).

Respecto a sus ventajas en LM, esta metodología ha permitido mejorar la regeneración funcional en modelos animales obteniéndose resultados prometedores para su utilización en la clínica. De hecho, la estimulación optogenética de NPCs *in vitro* deriva en una mayor diferenciación de dichos progenitores en oligodendrocitos y neuronas, el cambio de los astrocitos a un fenotipo antiinflamatorio y un incremento en la ramificación y crecimiento axonal en las neuronas diferenciadas, aún incluso en presencia de fármacos inhibitorios (Giraldo et al., 2021).

En conclusión, la optogenética es una tecnología reciente y útil que ha permitido incrementar nuestro conocimiento acerca de los circuitos neurales y la fisiopatología molecular detrás de enfermedades como el Parkinson, la adicción o el trastorno obsesivo-compulsivo. A esto se suma la multitud de avances que ha habido en esta metodología generándose una amplia variedad de opsinas que pueden emplearse para estimular o inhibir la actividad neural o controlar cascadas de señalización (Guru et al., 2015; Ordaz et al., 2017).

1.5. Corolario de la introducción

- El sistema nervioso es uno de los sistemas más importantes del cuerpo humano dividiéndose en SNC y SNP. A su vez, el SNC está compuesto por encéfalo y médula espinal en la cual se va a centrar el presente trabajo.
- La LM, causada por compresiones, laceraciones o contusiones de la médula espinal, afecta a miles de personas cada año suponiendo un elevado coste psicológico y económico. Por tanto, resulta de gran interés encontrar una terapia efectiva para dicha patología.
- La lesión medular se inicia con un daño primario que deriva en daños secundarios los cuales pueden dividirse en distintas fases (aguda, subaguda, intermedia y crónica). Asimismo, podemos diferenciar tres compartimentos en la LM: núcleo lesivo, cicatriz astrocítica y tejido neural sano pero reactivo.
- Las estrategias de regeneración se basan en cirugía, rehabilitación, fármacos y biomoléculas, exosomas, biomateriales, injertos tisulares, tratamiento celular y terapias combinadas. Sin embargo, estos métodos suelen fallar debido a los mecanismos inhibitorios que se dan en la lesión y la falta de un ambiente favorecedor para la regeneración.
- El tratamiento celular es uno de los enfoques más prometedores hasta el momento pudiendo trasplantar células exógenas o estimulando la función de las células progenitoras endógenas. Aun así, esta tecnología también cuenta con defectos como la pobre supervivencia celular o la limitada proliferación.
- Estas limitaciones está intentando abordarse mediante la aplicación de la optogenética, una metodología que se basa en la combinación de métodos ópticos y genéticos para el control espaciotemporal de poblaciones celulares concretas.

2. OBJETIVOS

La hipótesis del presente trabajo se fundamenta en el estudio del efecto sinérgico de la estimulación optogenética en la modulación de las propiedades neuroregenerativas de las NPCs trasplantadas tras la lesión medular. De acuerdo con dicha hipótesis, esta aproximación permitiría incrementar la supervivencia de las células del trasplante, así como su diferenciación en neuronas favoreciendo la integración en los circuitos neurales del huésped y la preservación funcional del tejido endógeno.

Por lo tanto, el principal objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la estimulación optogenética *in vivo* sobre las NPCs trasplantadas que expresan de forma ectópica la canalrodopsina-2 en un modelo subagudo de lesión medular en rata. Asimismo, también se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el efecto del tratamiento optogenético sobre la supervivencia celular tras el trasplante mediante el recuento de células trasplantadas.
- Determinar la identidad de las células trasplantadas, así como su grado de activación debido a la estimulación optogenética *in vivo*.
- Estudiar el grado de activación y preservación funcional del tejido circundante a la lesión tras la estimulación.
- Evaluar la extensión de la lesión mediante la medición del área de la proteína acídica fibrilar glial (GFAP) negativa tras la estimulación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Al no poseer el curso en experimentación animal, mi contribución a esta parte del estudio se centró en la obtención, expansión y mantenimiento de las NPCs, realizar las técnicas de inmunohistoquímica y el análisis posterior de las imágenes siendo el resto de actividades (mantenimiento de los animales, cirugías, pruebas funcionales, sacrificio y preparación del tejido) llevadas a cabo por otros usuarios del laboratorio.

3.1. *Obtención de las NPCs, cultivo, transfección y mantenimiento*

Las NPCs se obtuvieron a partir de médulas espinales de embriones de 15 días de ratas Sprague-Dawley-Tg(*Green Fluorescent Protein -GFP-*)2BalRrrc. Para ello, se diseccionaron en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) suplementada con penicilina y estreptomicina y el tejido fue disociado mecánicamente mediante pipeteo. Seguidamente, las NPCs fueron aisladas y cultivadas como neuroesferas en el medio *NeuroCult Proliferation Medium* (Stemcell Technologies, Francia) suplementado con *NeuroCult Proliferation Supplement* (Stemcell Technologies, Francia), 100 U/ml de penicilina (Sigma, Francia), 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma, Francia), 0,7 U/ml de heparina (Sigma, Francia), 20 ng/ml de EGF (Thermo Fisher, UK) y 20 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; Invitrogen, UK) en placas *ultra-low-attachment* (Corning Costar; EE.UU.). Finalmente, el cultivo primario obtenido se incubó a 37°C y 5% de CO₂ y se monitorizó diariamente empleando un microscopio invertido.

La expresión ectópica de hChR2-mCherry se consiguió mediante un vector adenoasociado de serotipo 9 (AAV9) generado a partir del constructo viral pAAV.CAG.hChR2(H134R)-mCherry.WPRE.SV40 (Addgene viral prep #100054-AAV9; <http://n2t.net/addgene:100054>; RRID: Addgene 100054). Para llevar a cabo la transducción de las NPCs, las neuroesferas se disociaron con acutasa (A1110501; Gibco, EE. UU.), se suspendieron en 200 µl de medio de cultivo con altas concentraciones del virus (1×10^5 unidades de transducción/célula) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. A continuación, las NPCs se depositaron de nuevo en las placas *ultra-low-attachment* y se dejaron crecer durante una semana en las mismas condiciones explicadas anteriormente para la formación de neuroesferas (Figura 5).

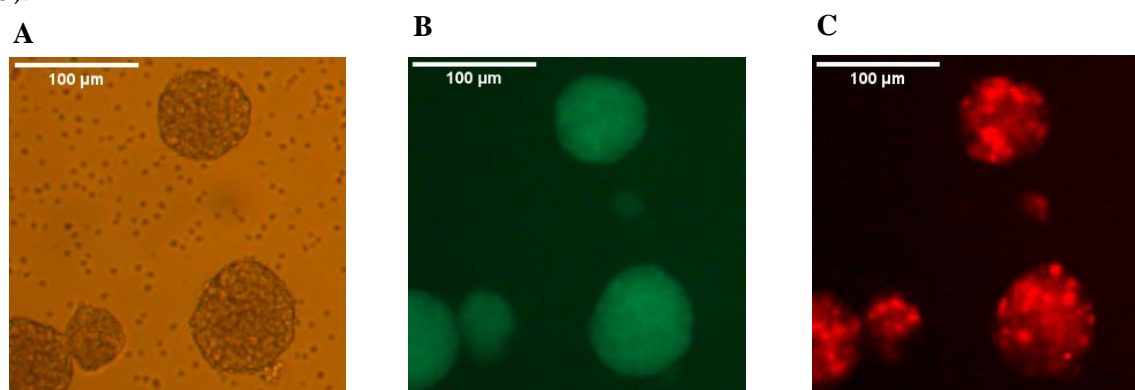


Figura 5. Imágenes de las NPCs-ChR2 formando neuroesferas. A) En campo claro. B) En microscopio de fluorescencia. En este caso puede comprobarse su procedencia de ratas SD-GFP+. C) En microscopio de fluorescencia. En esta imagen puede observarse la expresión de la ChR2 en las NPCs obtenidas.

3.2. Modelo de lesión medular: cirugía lesiva y tratamiento

3.2.1. Animales empleados

Como posterior modelo de lesión se emplearon ratas Sprague-Dawley de ocho semanas criadas en la Unidad de Experimentación del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia, España) siguiendo las recomendaciones de la Guía Nacional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (Real Decreto 1201/2005). A lo largo del experimento, las ratas fueron estabuladas en condiciones controladas de temperatura, con ciclos de luz/oscuridad de 12h y acceso permanente a comida y agua.

3.2.2. Generación de la lesión, trasplante de NPCs transfectadas con Chr2 y estimulación optogenética.

Una semana después de la obtención y transfección de las NPCs, con el fin de llevar a cabo la cirugía lesiva, se trató a las ratas con morfina (2,5 mg/kg) 30 minutos antes del procedimiento quirúrgico y se les indujo anestesia profunda mediante isoflurano al 3% manteniéndolo al 1,5% durante el resto de dicho procedimiento. Seguidamente se realizó una hemisección en la región derecha de la médula espinal a la altura de la octava vértebra torácica (T8). Este tipo de lesión es ampliamente empleada en la investigación de técnicas terapéuticas frente a la lesión medular como el trasplante de células (Kim et al., 2017).

Tras una semana de la generación de la lesión (fase subaguda), los animales fueron distribuidos en tres grupos de forma aleatoria (control lisado, trasplante no estimulado y trasplante estimulado) y se inició el procedimiento de implantación de NPCs. Para ello, se trasplantaron 1×10^6 células en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12* (DMEM/F12; Gibco, EE. UU.) siendo dicha suspensión (5 μ l) inyectada intramedularmente en la zona caudal a la lesión a una velocidad de 2 μ L/min con una pipeta de vidrio siliconado. A los grupos “estimulado” y “no estimulado” se le administraron las soluciones íntegras mientras que en los animales pertenecientes al “control lisado” la suspensión celular se lisó de forma previa con nitrógeno líquido para evaluar si la inyección del volumen celular tenía algún efecto *per se*.

El protocolo de estimulación optogenética se realizó con el sistema NeuroLux (NeuroLux, Inc; Samineni et al., 2017) el cual consta de un dispositivo medular que contiene un μ -LED azul. El dispositivo se implantó en todos los sujetos, pero sólo los animales del grupo “estimulado” fueron sometidos al siguiente protocolo de estimulación: 1 hora de estimulación optogenética diaria a 8 mW aplicado a 20 Hz durante ciclos de 5 ms encendido y 45 ms apagado hasta su sacrificio a las siete semanas (Figura 6).

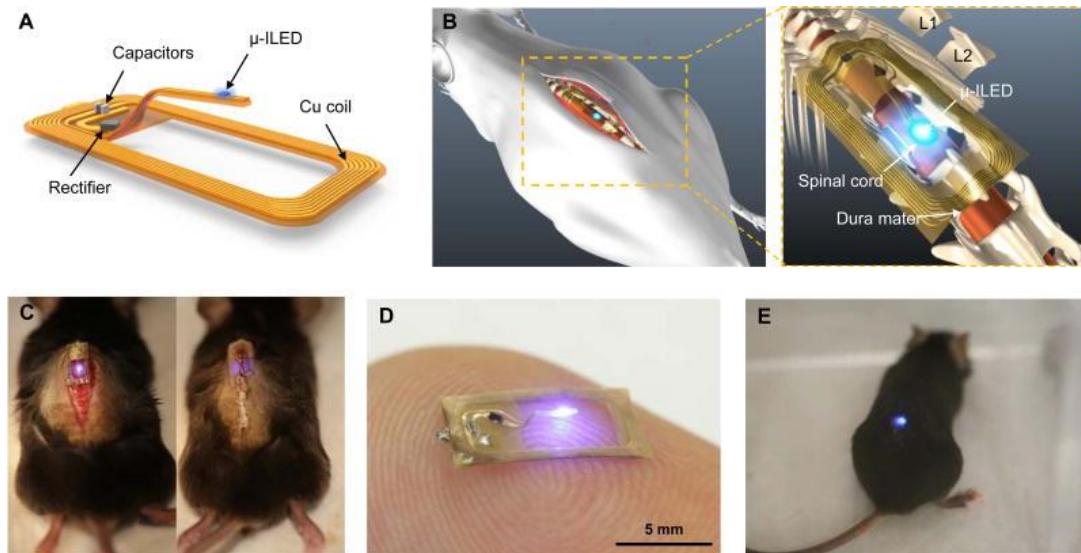


Figura 6 .Esquema del sistema de optogenética empleado. A) Ilustración esquemática del dispositivo medular de NeuroLux utilizado durante el experimento para la estimulación optogenética. Mediante dicho sistema se sometió a los animales a 1 hora diaria de fotoestimulación a 8 mW aplicado a 20 Hz durante ciclos de 5 ms de encendido y 45 ms de apagado. B) Diagrama de la disposición del dispositivo optogenético en la médula. En nuestro caso se posicionó a la altura de la octava vértebra torácica a diferencia de lo observado en la figura. C) Implantación del dispositivo medular en un modelo de ratón. Por el contrario, en el presente proyecto se emplearon como modelo de lesión medular ratas Sprague-Dawley. D) Imagen representativa del tamaño del dispositivo encendido. E) Imagen representativa de un ratón moviéndose libremente durante la fotoestimulación de la médula espinal. Imágenes obtenidas de Samineni et al., 2017.

Asimismo, a lo largo de las cinco semanas de ensayos, los animales fueron sometidos a cuidados postoperatorios. Además, para prevenir el rechazo de las células inyectadas, se les suministró diariamente el inmunosupresor FK506 (1 mg/kg) (Alastrue-Agudo et al., 2014).

El procedimiento al que fueron sometidas las ratas en su totalidad puede observarse en la figura 7.

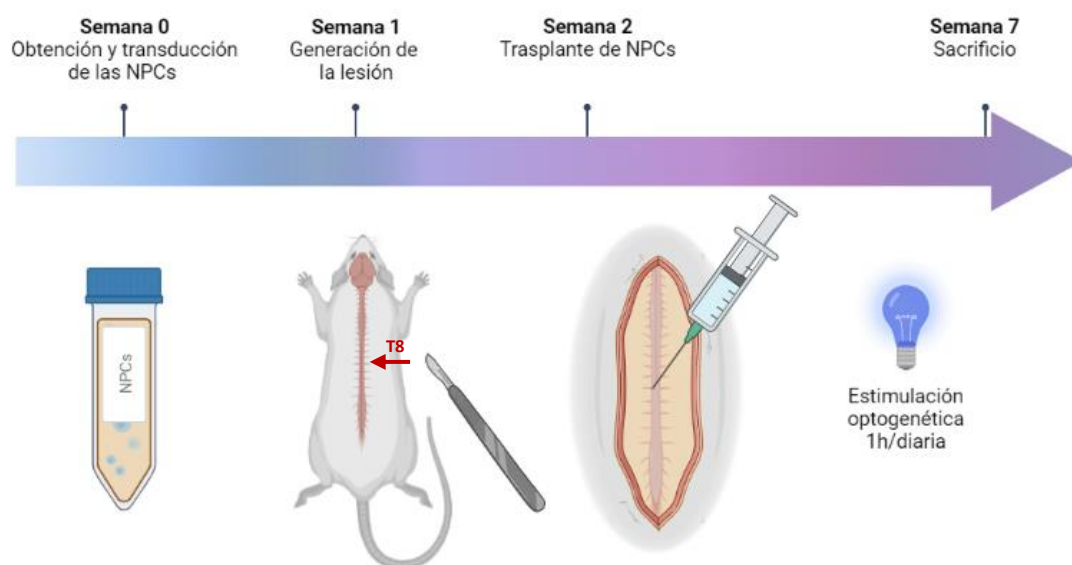


Figura 7 .Flujo de trabajo del ensayo in vivo. Imagen obtenida a partir de BioRender.

3.3. Preparación del tejido

Cinco semanas después de la realización de la lesión, las ratas fueron sacrificadas mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (100mg/kg). Tras dicha inyección, los animales fueron perfundidos cardiacamente con suero salino al 0,9% y seguidamente con paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato salino (PBS). A continuación, las médulas espinales fueron sustraídas, post-fijadas durante 2 horas con PFA 4% y almacenadas en PBS + Azida (0,05%) a 4°C. Seguidamente fueron criopreservadas a 4°C en una solución de sucrosa al 30% durante una semana, para posteriormente ser embebidas en *Tissue-Tek optimun cutting temperature* (OCT; Sakura Finetek Europe BV, Países Bajos). Por último, se cortaron láminas de 20 µm de grosor a partir de segmentos torácicos de 1,5 cm de la médula espinal (Figura 8). Dichos fragmentos laminados fueron preservados a -20°C hasta su procesamiento.

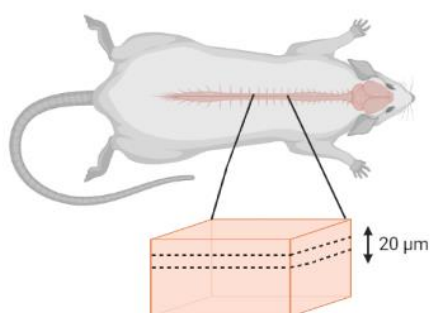


Figura 8. Esquema del corte de la médula espinal. A partir de fragmentos de 1,5cm se cortan láminas longitudinales de 20 micras de ventral a dorsal. Imagen obtenida a partir de BioRender.

3.4. Inmunohistoquímica

Para el posterior análisis de imagen, los segmentos de médula espinal fueron sometidos a un tratamiento de inmunohistoquímica. Para ello, en primer lugar, se introdujeron los portaobjetos seleccionados en una cámara húmeda y se marcaron sus bordes con un bolígrafo hidrofóbico con el fin de evitar la pérdida de los reactivos depositados posteriormente. Seguidamente, se cubrieron los portaobjetos con PFA 4% durante 15 minutos y se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1x. A continuación, y con el objetivo de bloquear los sitios de unión inespecíficos, se añadió la solución de bloqueo, constituida por 10% de suero fetal bovino (FBS; Merck, Alemania), 5% de suero de caballo (HS; Thermo Fisher, EE. UU.) y Tritón X-100 (Merck, Alemania) 0,5% en PBS, dejándola reposar durante 1 hora. Al finalizar la espera, se dispuso sobre los fragmentos de médula 200 microlitros de la solución correspondiente de anticuerpos primarios en medio de bloqueo (las diluciones concretas para cada anticuerpo quedan detalladas en la tabla 1). Los portaobjetos se incubaron toda la noche con esta solución a 4°C.

Al día siguiente, se recuperó la solución de anticuerpos primarios y se llevaron a cabo 3 lavados de 5 minutos con PBS 1x para posteriormente incubar 1 hora con la solución de anticuerpos secundarios (Tabla 2). Tras la incubación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1x y se incubó con una dilución 1/1000 de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma Aldrich, EE. UU.) en PBS 1x durante el mismo tiempo con el fin de marcar los núcleos celulares para, después, lavar de nuevo tres veces. Por último, se montaron los cubreobjetos sobre los portas con ayuda del reactivo Mowiol (Sigma Aldrich, EE.UU.).

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en las reacciones de inmunohistoquímica.

Anticuerpo primario	Marcaje	Dilución
<i>cfos</i> rabbit (ab190289; Abcam)	Marcador células activadas	1/400
<i>mCherry</i> guinea pig (390004; Synaptic System)	Marcador células transfectadas con ChR2	1/1000
<i>NeuN</i> chicken (abN91; Abcam)	Marcador núcleo neuronas	1/200
<i>GFAP</i> rabbit (z0334; Agilent)	Marcador astrocitos	1/800
<i>GFP</i> chicken (ab13970; Abcam)	Marcador células trasplantadas	1/1000
<i>B-III tubulin</i> mouse (ab78078; Abcam)	Marcador citoesqueleto	1/400

Tabla 2. Anticuerpos secundarios empleados en las reacciones de inmunohistoquímica (AlexaFluor).

Anticuerpo secundario	Dilución
α -chicken 488 (A11039; Invitrogen)	1/400
α -guinea pig 555 (A21435; Invitrogen)	1/400
α -mouse 555 (A21422; Invitrogen)	1/400
α -rabbit 647 (A21244; Invitrogen)	1/400

3.5. Análisis de imagen

Los portaobjetos se escanearon con el equipo APERIO Versa digital Scanner (Leica) o el microscopio Zeiss ApoTome (Carl Zeiss) y las imágenes se analizaron en ImageJ siguiendo el siguiente flujo de trabajo para cada uno de los objetivos:

Número de células NeuN, cfos, mCherry y GFP positivas y colocalización de marcadores. Para el recuento de células correspondientes a los distintos marcajes se sustrajo el fondo en cada imagen (50.0 pixels) con el fin de visualizar mejor las señales de los anticuerpos secundarios. Seguidamente, se combinó la imagen de cada uno de los marcajes con la señal de DAPI (marcaje nuclear) para contar las células positivas y con otro de los marcadores en caso de querer detectar colocalización. Asimismo, se delimitaron tres áreas para el conteo en cada uno de los animales analizados: caudal, lesión y rostral. Por último, las células presentes en dichas áreas, así como las colocalizaciones se contaron empleando la herramienta “*Cell Counter*” de ImageJ.

Área GFAP negativa. Para definir el tamaño y la morfología de la lesión se recurrió a la medición del área GFAP negativa (GFAP-) ya que la zona dañada se encuentra delimitada por la cicatriz astrocítica lo cual nos permite establecer con precisión los bordes de dicha lesión. Con este fin, se dibujó el área con la herramienta “*Polygon selections*” y se midió su tamaño mediante ImageJ. A continuación, se midió el área total de la loncha y se empleó dicho valor para normalizar el área de la lesión.

3.6. Análisis estadístico

Finalmente, los resultados se ilustraron en gráficas y fueron analizados estadísticamente mediante el software GraphPad Prism versión 8.0.2. En primer lugar, para estudiar si los datos seguían una distribución normal, se empleó el test de Shapiro-Wilk. Seguidamente, para llevar a cabo las comparaciones múltiples, en caso de que los datos siguieran una distribución normal, se utilizó un análisis *ordinary one-way ANOVA* paramétrico seguido del test post-hoc de Bonferroni el cual permitió establecer las diferencias entre grupos. Por el contrario, si los datos no se ajustaban a una distribución gaussiana, las comparaciones múltiples se realizaron mediante un análisis *ordinary one-way ANOVA* no paramétrico seguido del test post-hoc de Kruskal-Wallis. Asimismo, para comparar el número de células GFP y mCherry se empleó *unpaired t test* entre los grupos estimulado y no estimulado. Por último, en el caso del área GFAP negativa, se llevó a

cabo un análisis *area under curve* (AUC) puesto que se observó que dicho valor variaba a lo largo de la profundidad de la médula. A continuación, sobre el AUC se usó de nuevo un análisis *ordinary One-way ANOVA* paramétrico.

Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM) y las diferencias fueron consideradas como significativas si el p-value $< 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. La estimulación optogenética in vivo podría tener efectos sobre la supervivencia de las células del trasplante

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta la terapia celular es la pobre supervivencia de las células trasplantadas. En este trabajo se planteaba la optogenética como metodología conjunta para afrontar dichas limitaciones puesto que en trabajos anteriores se había observado que dicha fotoestimulación favorecía la proliferación de las NPCs-ChR2 *in vitro* (Giraldo et al., 2021). Para evaluar dicho efecto se superpusieron los marcadores *mCherry* (NPCs-ChR2) y DAPI (núcleos celulares) permitiendo así identificar las células del trasplante que expresaban la ChR2. Los resultados *in vivo* muestran una tendencia al alza en los animales que han recibido la fotoestimulación pudiendo ésta tener algún efecto sobre la supervivencia de las células del trasplante a pesar de que dichos resultados no presentan significancia estadística (Figura 9). Por este motivo, resultaría conveniente incrementar el número de animales en cada grupo de estudio para comprobar si esta tendencia se mantiene y si resulta significativa.

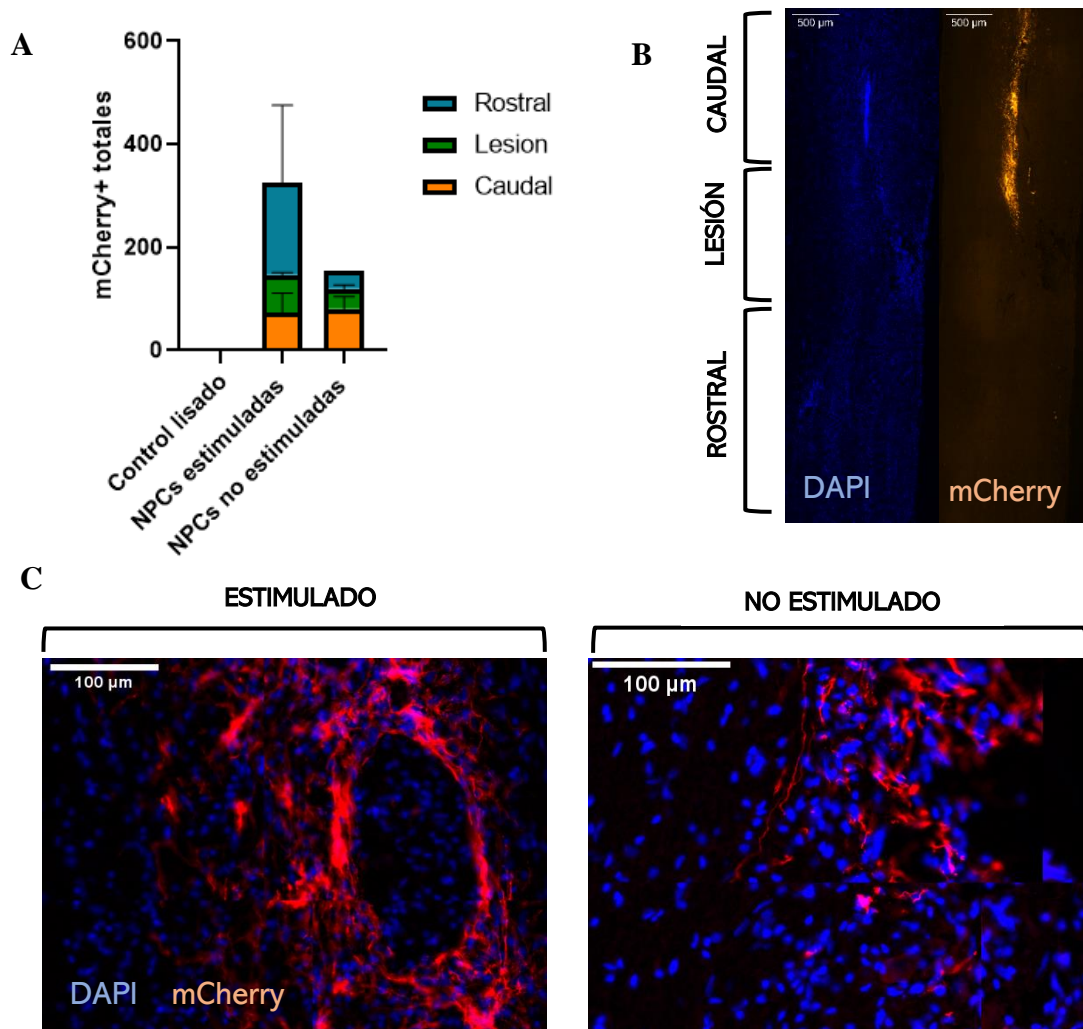
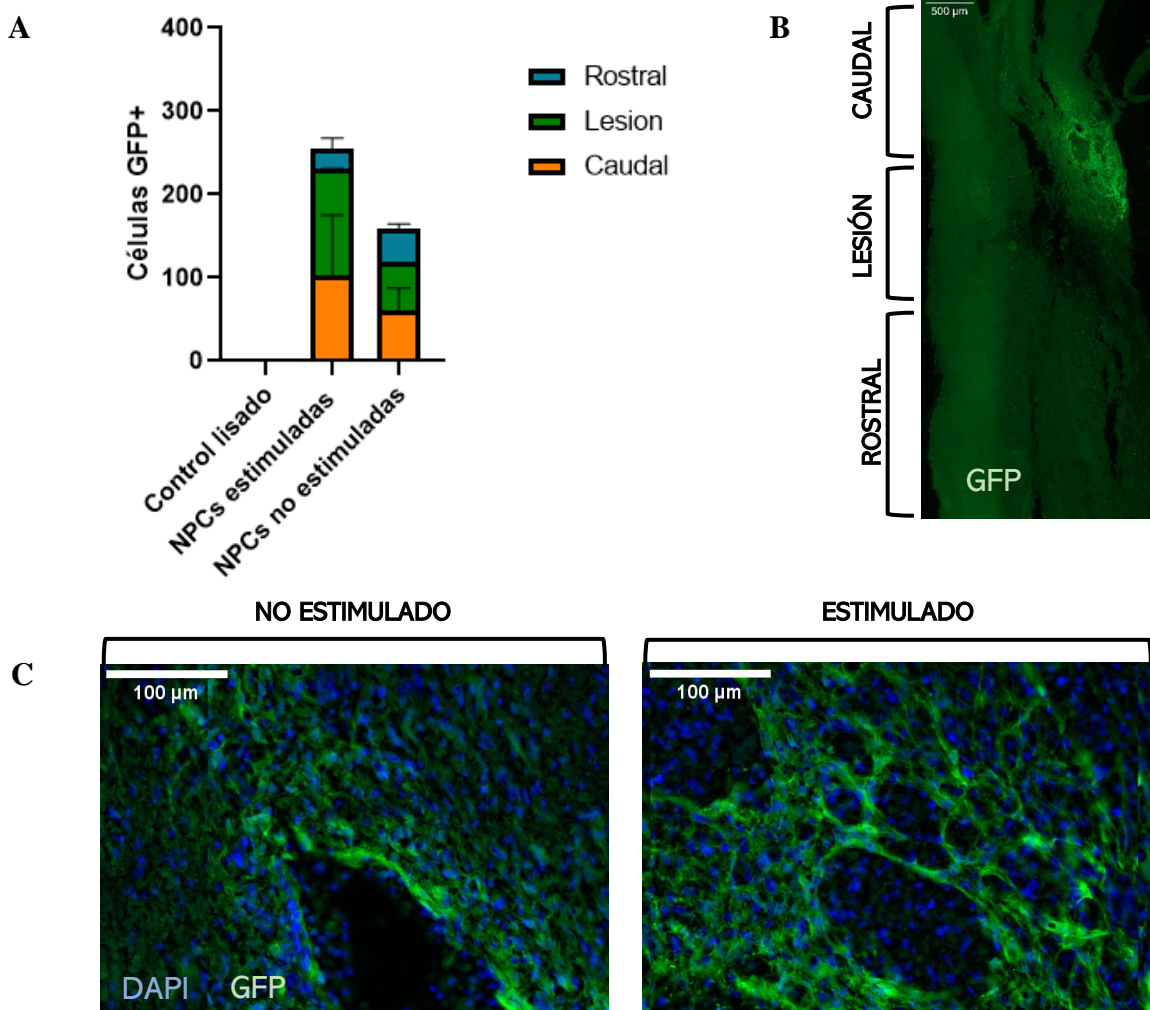


Figura 9. Efecto de la activación de ChR2 sobre la supervivencia de las células trasplantadas transfectadas. A) Cuantificación de células *mCherry* positivas entre grupos. Los valores representan la media \pm SEM. No se apreció ningún tipo de significancia estadística (*unpaired t test*; p -value $>$ 0,05, $n=2$ para estimulado y no estimulado), pero sí parece haber una tendencia al alza en los animales estimulados. B) Vista panorámica de los marcajes DAPI y *mCherry*. DAPI permite la localización de núcleos celulares y *mCherry* la identificación de las NPCs trasplantadas transfectadas. Ambas imágenes pertenecen a animales trasplantados y estimulados. C) Imágenes de NPCs-ChR2 positivas superpuestas con DAPI.

Esta tendencia a una mayor supervivencia de las células trasplantadas también puede observarse en el recuento de células GFP positivas, valor que nos informa acerca del total de las células del trasplante (tanto transfectadas como no transfectadas). Para llevar a cabo dicha medición se empleó la colocación entre los marcadores GFP (la línea de rata de la que se obtuvieron las NPCs expresaba dicho marcador en todas sus células) y DAPI identificándose así las células que constituían progenitores neurales trasplantados. En este caso, como ya se ha descrito, y al igual que en la cuantificación de *mCherry*, parece haber un mayor mantenimiento de estas células en los animales sometidos a la estimulación optogenética, aunque los resultados no son estadísticamente significativos (Figura 10).



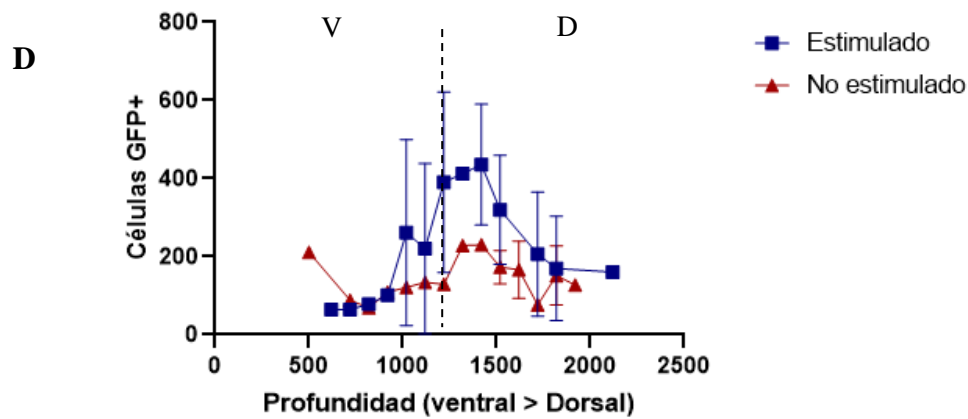


Figura 10. Efecto de la estimulación optogenética sobre la supervivencia de las células trasplantadas totales. A) Cuantificación de células GFP positivas entre grupos. Los valores se expresan como la media \pm SEM. No se observaron cambios estadísticamente significativos entre dichos grupos (*unpaired t test*; *p-value* > 0,05, *n*=2 para estimulado y no estimulado), pero sí parece haber una mayor supervivencia en los animales estimulados. B) Vista panorámica de las NPCs trasplantadas. El marcador GFP permite detectar la totalidad de las células del trasplante (tanto transfectadas como no transfectadas). La imagen pertenece a un animal del grupo estimulado. C) Imágenes de células GFP positivas superpuestas con DAPI. D) Células GFP positivas distribuidas de ventral a dorsal (V: ventral; D: dorsal). Como puede observarse las células trasplantadas se concentran en un posición más dorsal.

Como ya se ha comentado anteriormente, la supervivencia de las células del trasplante es uno de los principales problemas a los que se enfrenta la terapia celular precisándose de tratamientos de soporte (como el suministro de ChABC y neurotrofinas) que permitan mejorar ese parámetro (Jin et al., 2016). Este hecho podría deberse a la liberación de agentes inhibidores por parte del tejido cicatrizante lo cual a su vez impide la proliferación de NSCs locales (Ke et al., 2006; Martens et al., 2002; Tian et al., 2007). En el presente proyecto se propone la optogenética como tecnología para afrontar estas limitaciones ya que la iluminación con luz azul de la ChR2 permite la despolarización celular mediante un influjo de cationes como Na^+ , K^+ , H^+ y Ca^{2+} favoreciendo así la expresión de factores pro-supervivencia mediante múltiples vías de señalización (Lonze & Ginty, 2002; Yu et al., 2019). Por ejemplo, la activación de la proteína quinasa dependiente de calmodulina II (CaMKII) debido al incremento de calcio intracelular modula la progresión del ciclo celular y la proliferación (Kahl & Means, 2003). De hecho, como se ha visto en los resultados anteriores, la fotoestimulación parece tener un efecto positivo sobre la supervivencia de las NPCs trasplantadas lo que favorecería la neuroregeneración y recuperación funcional de la LM (Sankavaram et al., 2019).

4.2. La estimulación optogenética in vivo incrementa la diferenciación de las NPCs trasplantadas a neuronas

En estudios anteriores se había comprobado la capacidad de la estimulación optogenética para aumentar la diferenciación *in vitro* de las NPCs a neuronas (Giraldo et al., 2021), por lo que en el presente trabajo se establece la hipótesis de que esto puede ocurrir también *in vivo*. Para determinar el efecto de la fotoestimulación sobre la diferenciación neuronal se cuantificaron aquellas células *mCherry* positivas que expresaban *NeuN*, es decir, células trasplantadas transfectadas que se habían diferenciado a neuronas. *NeuN* es una proteína localizada en el núcleo y citoplasma perinuclear de la mayoría de las neuronas del SNC en mamíferos (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015) por lo que puede emplearse para identificar dichas células (Lattard et al., 2021). Los resultados demostraron que, efectivamente, aquellos animales que habían recibido la estimulación mediante luz azul presentaban una mayor diferenciación hacia neuronas (Figura 11).

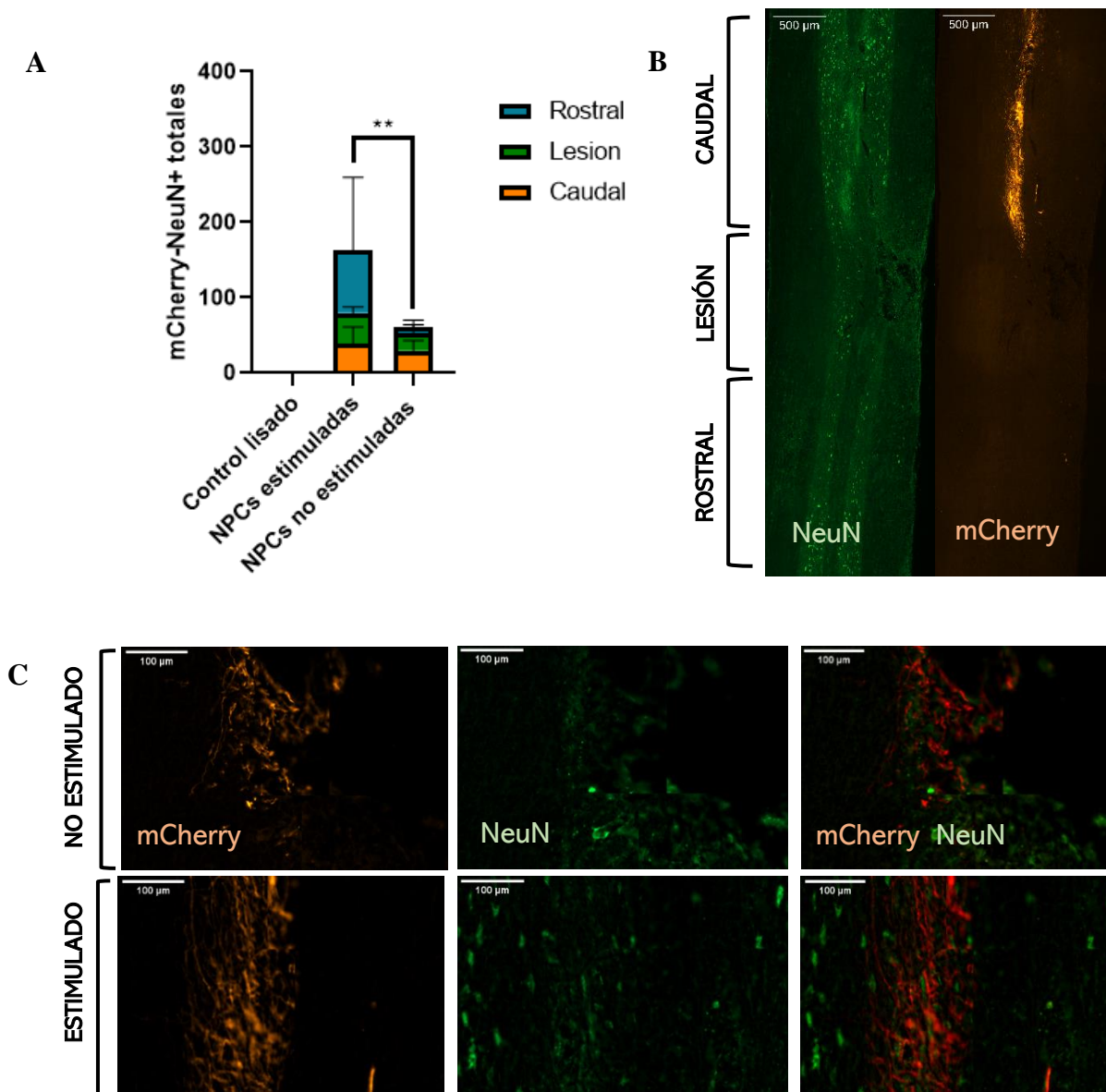


Figura 11. Efecto de la estimulación optogenética sobre la diferenciación de las NPCs trasplantadas a neuronas. A) Cuantificación de la diferenciación celular a neuronas entre grupos. Los valores se expresan como la media \pm SEM. En este caso sí se observaron cambios con significancia estadística (unpaired *t* test; *p*-value = 0,0018, *n*=2 para estimulado y no estimulado), por lo que podemos afirmar que existe una mayor diferenciación de las NPCs a neuronas en los animales estimulados. B) Vista panorámica de los marcadores empleados para el presente análisis. NeuN informa acerca de los núcleos neuronales mientras que mCherry permite la detección de las células trasplantadas y transfectadas. Las imágenes pertenecen a animales trasplantados y estimulados. C) Imágenes de NPCs-mCherry diferenciadas a neuronas detectadas mediante el doble marcaje de mCherry y NeuN.

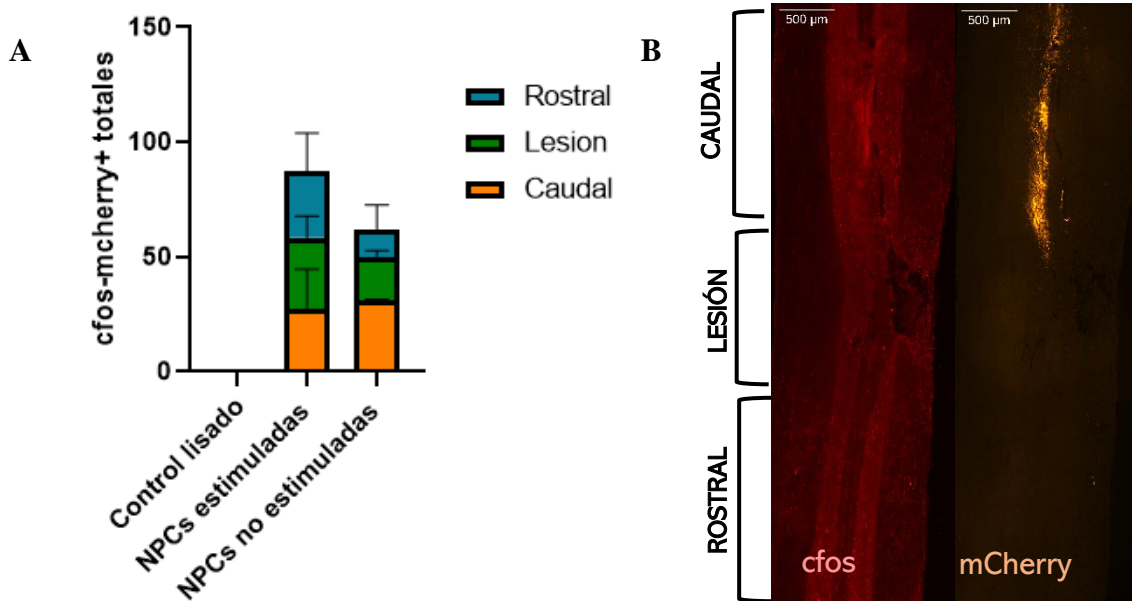
La escasa diferenciación es otro de los retos a los que se ve sometida la terapia celular (de Feo et al., 2012). Este inconveniente puede abordarse mediante la estimulación de la ChR2. De hecho, en estudios anteriores, ya se ha comprobado que la fotoestimulación es capaz de regular al alza genes involucrados en la diferenciación neural, crecimiento axonal y plasticidad sináptica permitiendo así reemplazar las células neurales perdidas tras el trauma y favoreciendo la recuperación funcional tras un derrame cerebral (Daadi et al., 2016). De igual forma, también se ha evaluado la capacidad de la estimulación optogenética para favorecer la diferenciación de ESCs a neuronas maduras (Stroh et al., 2011) y el incremento en esta diferenciación tras someter

a NPCs a estimulación eléctrica (Chang et al., 2011; Kobelt et al., 2014). En nuestro caso, la fotoestimulación aumentó significativamente la diferenciación a neuronas en animales estimulados, lo que podría deberse a la despolarización causada, así como al potencial de acción derivado de los canales de voltaje dependientes de calcio (VGCCs) conllevando ambos procesos un incremento de calcio intracelular que promoviera la producción de AMPc promoviendo la diferenciación a neuronas de las NPCs trasplantadas (Lepski et al., 2013).

4.3. La estimulación optogenética del trasplante celular no afecta a la activación celular de las NPCs trasplantadas ni a la activación global in vivo

Con el fin de estudiar el efecto de la fotoestimulación sobre la activación de las células trasplantadas y endógenas se llevó a cabo el marcaje inmunohistoquímico con *cfos*. Este marcador constituye una proteína nuclear involucrada en la regulación de la expresión génica codificada por un protooncogén (*Fos*) (Curran et al., 1984). Dicha proteína se ha observado que es capaz de asociarse a la cromatina y puede unirse al DNA in vitro apoyando estos descubrimientos su función como proteína reguladora (Renz et al., 1987; Sambucetti & Curran, 1986). Asimismo, estudios de co-transfección indicaron que esta proteína puede actuar como activador de la expresión génica (Morgan & Curran, 1991; Setoyama et al., 1986) por lo que resulta una diana útil para el estudio de la activación celular.

Para evaluar dicha activación en las NPCs trasplantadas se llevó a cabo la superposición de los marcadores *cfos* y *mCherry*. Al cuantificar aquellas NPCs-ChR2 que también expresaban *cfos* no se observaron variaciones significativas estadísticamente entre los animales estimulados y los no estimulados (Figura 12). No obstante, sí parece haber una tendencia a una mayor activación en las células trasplantadas estimuladas por lo que sería conveniente analizar un mayor número de animales con el fin de tener una visión más amplia sobre este efecto *in vivo*.



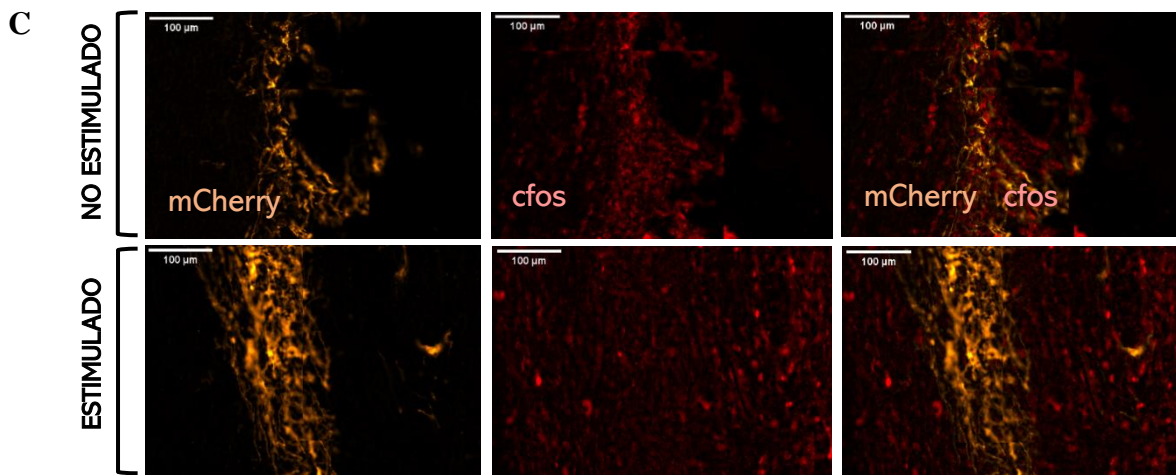
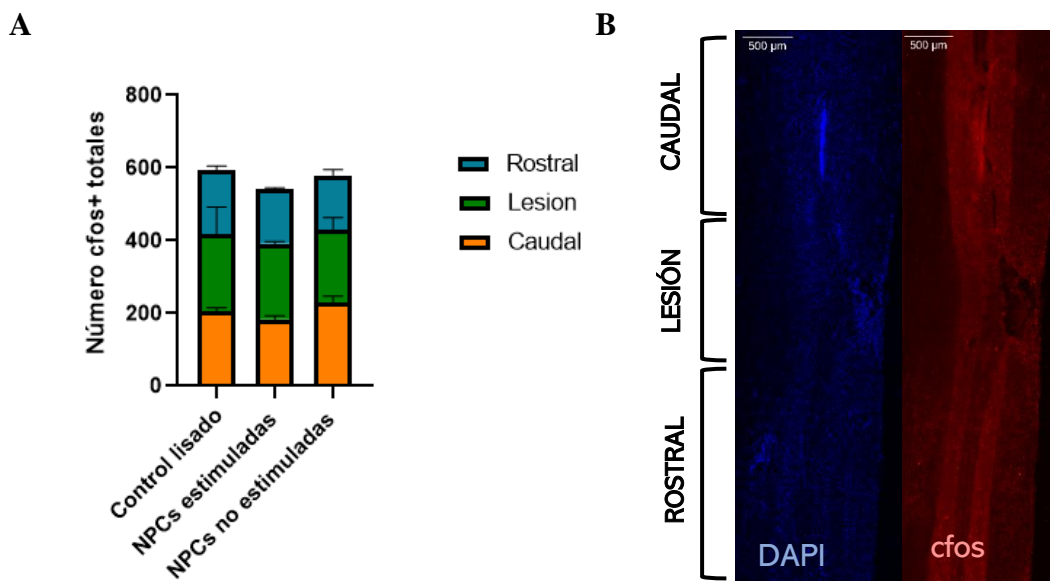


Figura 12. Efecto de la fotoestimulación sobre la activación de las NPCs transfectadas trasplantadas.
 A) Cuantificación de células mCherry activadas entre grupos. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. No se observaron cambios con significancia estadística (unpaired t test; p-value > 0,05, n=2 para estimulado y no estimulado), pero sí parece haber una mayor activación de estas células en los animales estimulados. B) Vista panorámica de los marcadores empleados en el presente análisis inmunohistoquímico. La combinación de ambos marcadores permite la detección de las NPCs trasplantadas transfectadas activadas. Las imágenes proceden de un animal del grupo “estimulado”. C) Imágenes de NPCs-mCherry activadas detectadas mediante el doble marcaje de mCherry y cfos.

Respecto a la activación celular global, la hipótesis se basa en la capacidad de la ChR2 para provocar la despolarización de las células, y por ende su activación, mediante su apertura (Guru et al., 2015; Ordaz et al., 2017). Por tanto, si la estimulación optogenética es capaz de provocar la apertura de dicho canal también tendrá capacidad de producir la activación celular. Sin embargo, como puede verse en las imágenes y el gráfico (Figura 13), no se ha obtenido significancia estadística para la diferencia entre grupos en lo referente al número de células cfos positivas mostrando prácticamente los mismo niveles animales estimulados y no estimulados.



C

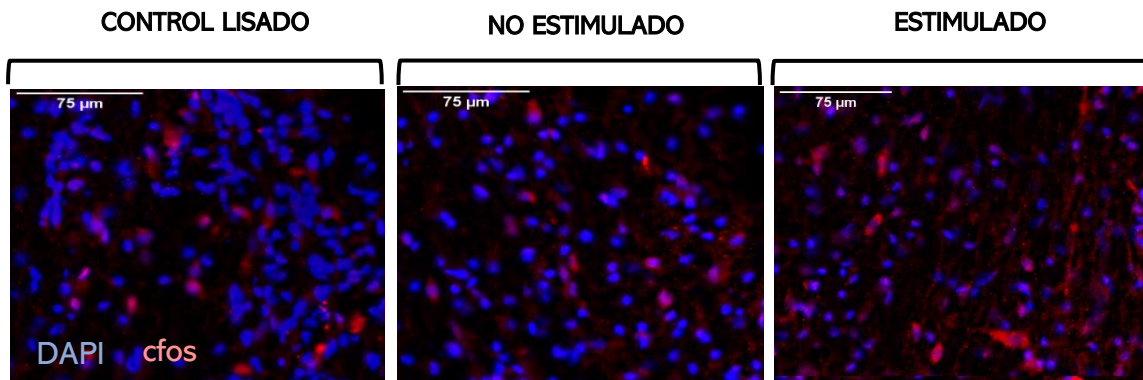
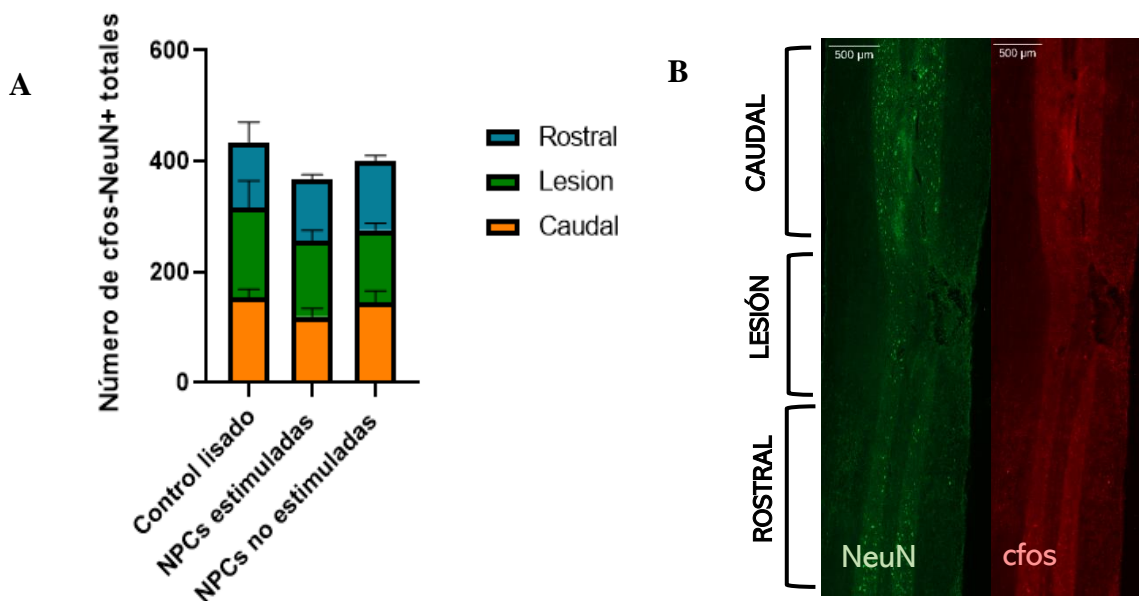


Figura 13. Efecto de la estimulación optogenética sobre la activación celular global. A) Cuantificación de las células *cfos* positivas entre grupos. Los resultados se muestran como la media \pm SEM. Como se observa no hay diferencias significativas estadísticamente (ANOVA, $n=2$ para control lisado y no estimulado y $n=4$ para estimulado) B) Vista panorámica de los marcadores empleados en este análisis histológico. DAPI marca los núcleos celulares mientras que *cfos* actúa como marcador de células activadas. Las fotografías pertenecen a animales trasplantados y estimulados. C) Imágenes de células activadas detectadas mediante marcaje con *cfos* superpuesto a DAPI para identificar las señales positivas.

Finalmente, para estudiar el efecto de la estimulación optogenética sobre la activación de las células neuronales del tejido endógeno se empleó la colocalización entre los marcadores *cfos* y *NeuN*. En este caso, se hipotetiza que la fotoestimulación de las NPCs trasplantadas puede crear un ambiente favorecedor para la activación de las neuronas endógenas. Sin embargo, en los resultados sobre la activación no se observaron variaciones significativas entre grupos estudiados (Figura 14) por lo que la estimulación optogenética no parece tener efecto sobre el valor de activación de las neuronas endógenas.



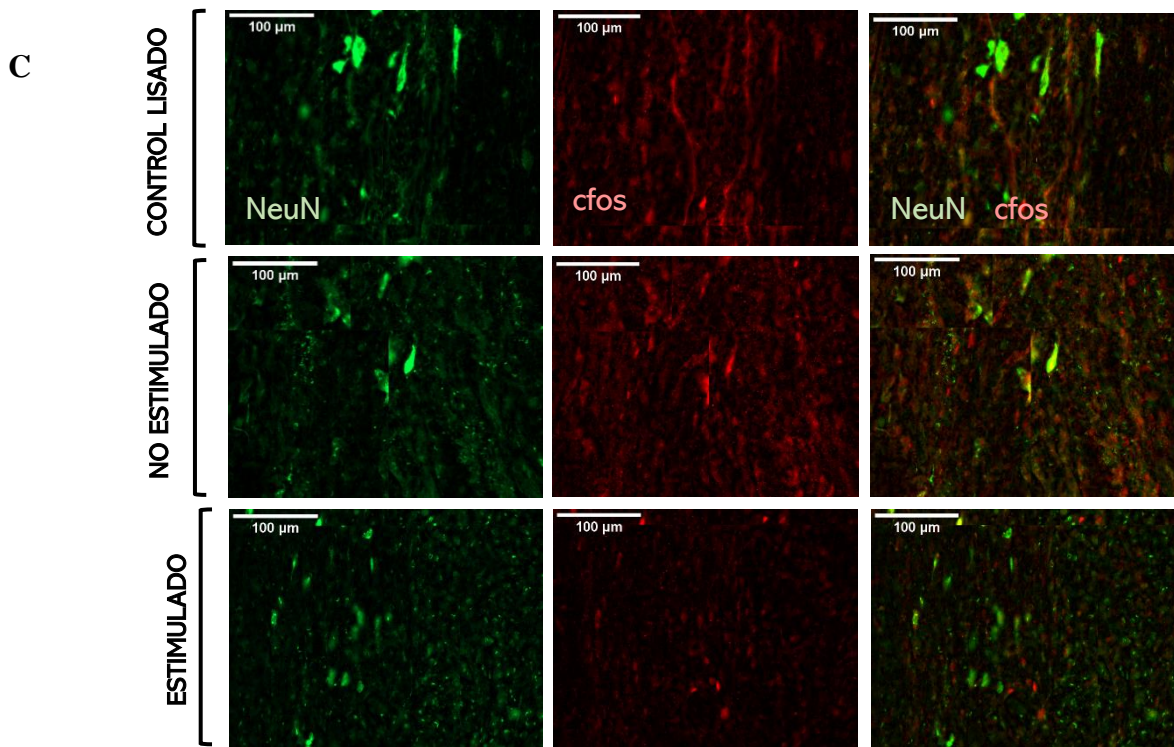


Figura 14. Efecto de la estimulación optogenética sobre la activación de neuronas endógenas.
 A) Cuantificación de las neuronas activadas encontradas en cada grupo. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. No se apreció ningún cambio con significancia estadística (ANOVA, $n=2$ para control lisado y no estimulado, $n=4$ para estimulado). B) Vista panorámica de NeuN y cfos. NeuN actúa como marcador de núcleos neurales mientras que cfos permite el marcaje de células activadas. Las fotografías pertenecen a animales trasplantados y estimulados. C) Imágenes de neuronas activadas identificadas gracias al doble marcaje de NeuN y cfos.

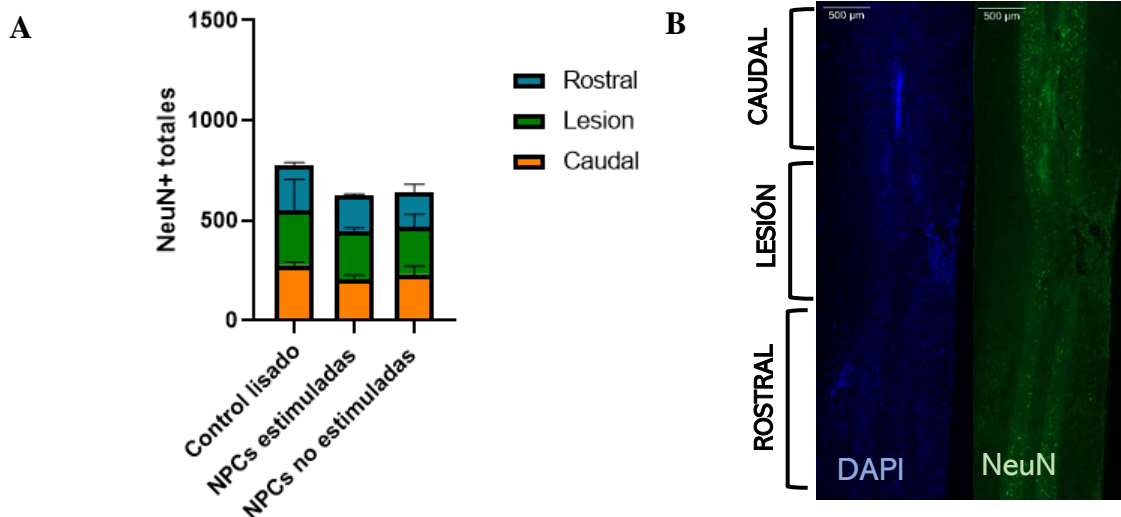
Como ya se ha visto, se hipotetizaba que si la luz azul es capaz de provocar la apertura de la ChR2 también tendrá capacidad para despolarizar las células que la expresan y, por ende, activarlas. De hecho, en estudios anteriores se ha observado la capacidad de la optogenética para activar células en regiones dañadas y recuperar funciones tales como la respiración o la actividad muscular (Alilain et al., 2008; Andersson et al., 2016). Además, también se esperaba que la activación de las NPCs trasplantadas fuera capaz de crear un ambiente favorecedor para la consiguiente activación de las neuronas endógenas. Este efecto fue estudiado, entre otros, por Bryson et al. (2014) quien observó que motoneuronas modificadas para expresar la ChR2 fueron capaces de generar un ambiente neuroregenerador tras la estimulación permitiendo restaurar la función del músculo dañado. Sin embargo, en nuestro caso no se han visto efectos sobre la activación celular global *in vivo* presentando prácticamente el mismo número de células cfos positivas los tres grupos. Aun así, sí que se ha visto una tendencia al alza, aunque carente de significancia estadística, en la activación de las NPCs del trasplante tras la estimulación optogenética. Por lo tanto, esta falta de diferencias en la activación global podría deberse a que no estamos diferenciando entre neuronas excitatorias e inhibitorias puesto que es probable que la estimulación optogenética favorezca la activación de un tipo específico de neurona y disminuya la activación de otro tipo resultando el cómputo global en una variación nula. Para evaluar este efecto se precisaría de un marcador diferente a cfos, ya que este se ve expresado tanto en neuronas inhibitorias como excitatorias, que colocalizara con el mismo y nos permitiera definir la identidad de la célula (Staiger et al., 2002; Todd et al., 1994). Como ejemplos de estos marcadores, podrían

emplearse proteínas codificadas por el gen Gad1 con el fin de identificar las neuronas inhibitorias y por el gen Sc117a6 para detectar las neuronas excitatorias (Kodama et al., 2012)

4.4. La fotoestimulación *in vivo* de las células trasplantadas no afecta a la preservación de las neuronas endógenas en la lesión

Para estudiar la posible preservación de las neuronas endógenas en nuestro diseño experimental, se empleó el marcador nuclear neuronal *NeuN* superpuesto a DAPI para diferenciar las señales positivas de los agregados formados durante el procedimiento de inmunohistoquímica. Al cuantificar las células *NeuN* positivas en los tres grupos, no se vieron diferencias significativas en el número de neuronas en los tres grupos de estudio (Figura 15).

En este caso, se hipotetizaba que la optogenética podría tener un papel neuroprotector sobre el ambiente de la lesión favoreciendo la preservación de las neuronas endógenas tras la LM. De hecho, el propio trasplante de precursores neurales ya tiene un impacto sobre el medio de la lesión influenciando positivamente sobre las células endógenas (Ahuja & Fehlings, 2016; Mothe & Tator, 2013). Respecto al rol de la optogenética, estos mecanismos ya han sido descritos con anterioridad en otras enfermedades como el Alzheimer donde la fotoestimulación tiene un efecto positivo sobre la fisiopatología mediante la reducción de la inflamación o mejora cognitiva. Por tanto, si esto ocurre en otras patologías, en la LM la estimulación optogenética debería promover el mantenimiento del tejido mediante mecanismos antiinflamatorios y neuroprotectores (Z. Zhang et al., 2020). No obstante, tal como se observa en los resultados descritos esto no ocurre en el presente modelo pues la fotoestimulación *in vivo*, con la muestra evaluada, no muestra tener efectos sobre la preservación de las neuronas endógenas tras la lesión. Sin embargo, debido a la novedad de la técnica, el impacto de la optogenética sobre este parámetro no está claro debiéndose analizar un mayor número de animales para obtener conclusiones precisas.



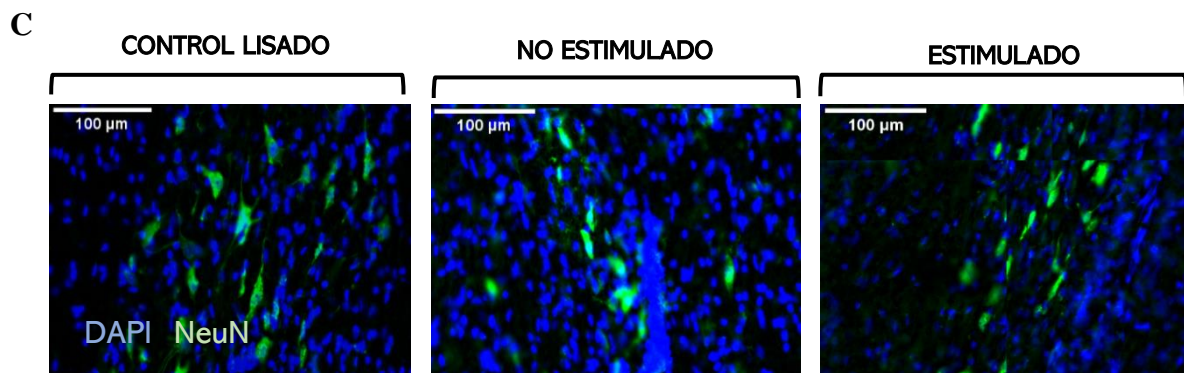
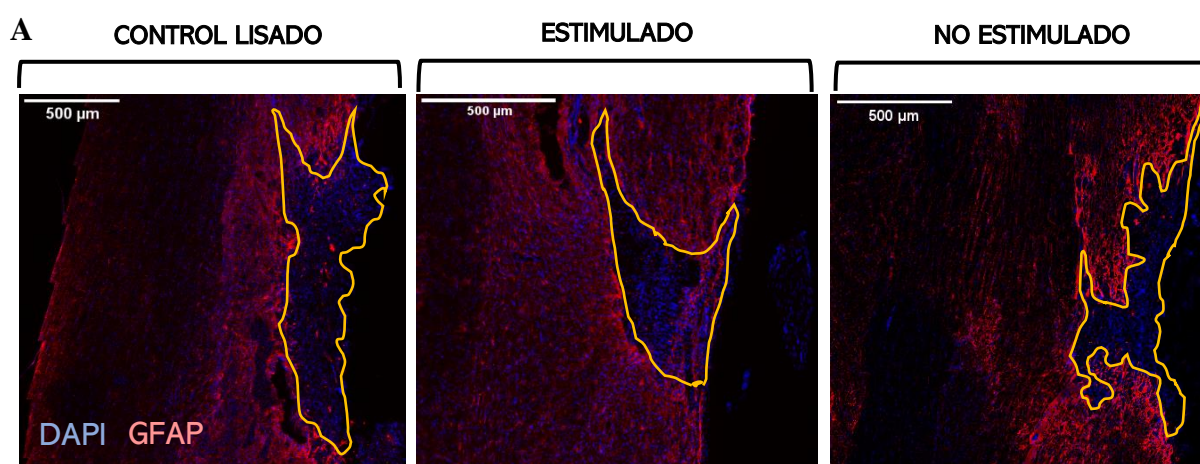


Figura 15. Efecto de la fotoestimulación sobre la preservación neuronal. A) Imagen de neuronas identificadas mediante marcaje con NeuN superpuesto a DAPI. B) Cuantificación de las células NeuN positivas entre grupos. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. No se observaron cambios con significancia estadística (ANOVA, $n=2$ para control lisado y no estimulado y $n=4$ para estimulado). C) Vista panorámica de los marcadores DAPI y NeuN. DAPI marca la totalidad de núcleos celulares mientras que NeuN los núcleos de las neuronas. Ambas imágenes pertenecen a un animal trasplantado y estimulado.

4.5. La estimulación optogenética in vivo de las NPCs trasplantadas reduce el tamaño del área de la lesión

Como ya se ha comentado en la introducción, el área de la lesión queda rodeada por una fina cicatriz astrocítica que actúa protegiendo el tejido sano adyacente, pero, a su vez, bloquea la neuroregeneración (Sofroniew, 2015). Esta área cicatrizante delimitante puede emplearse para cuantificar el tamaño del área de la lesión. Con este fin, se superpusieron los marcadores GFAP (marcador astrocítico) y DAPI (marcador nuclear) y se midió el tamaño del área GFAP negativa, es decir, la equivalente a la lesión. Los resultados obtenidos demuestran una reducción estadísticamente significativa de dicha área en los animales estimulados frente a los grupos control y no estimulado (Figura 16).



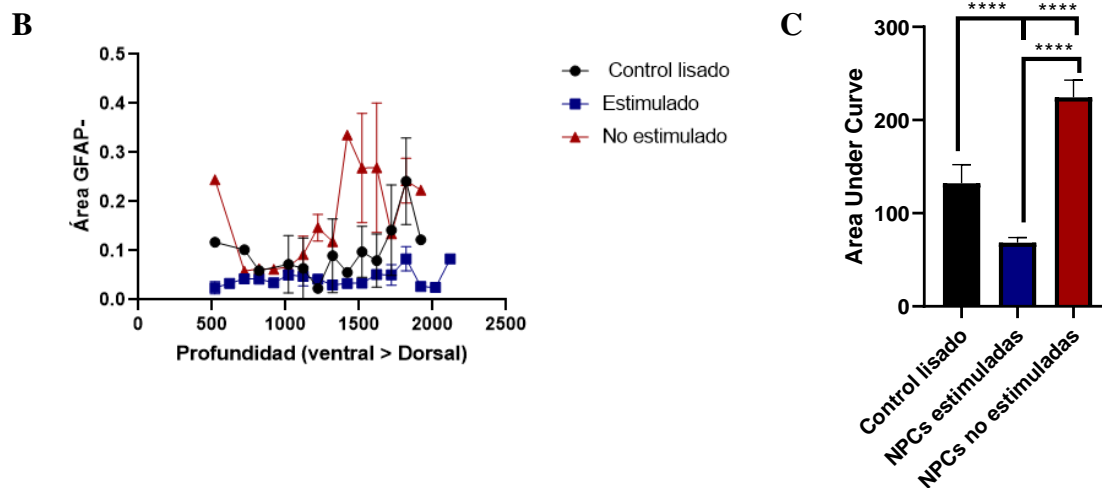


Figura 16. Efecto de la estimulación optogenética de las NPCs trasplantadas sobre el área de la lesión. A) Imágenes del área GFAP negativa entre los distintos grupos B) Distribución del área de la lesión de ventral a dorsal en los distintos grupos. C) Cuantificación del área bajo la curva (análisis AUC). Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Se observan diferencias significativas entre los grupos (**** equivale a un p-value $< 0,0001$; $n=2$ para control lisado y no estimulado y $n=4$ para estimulado).

De igual forma que en el caso anterior, en este supuesto la hipótesis se basaba en la generación de un ambiente neuroregenerador para la lesión derivado de la estimulación optogenética de las NPCs trasplantadas. En estudios anteriores ya se ha observado que el trasplante de precursores neuronales da lugar a un ambiente no inhibitorio apto para la recuperación funcional. Asimismo, con su actividad paracrina, modula la respuesta inflamatoria y aporta al área de la lesión factores de crecimiento y soporte neurotrófico (Courtine & Sofroniew, 2019). También se ha evaluado la capacidad de estas células para autoensamblarse en dominios sensoriales y motores, así como para facilitar la reinervación y actuar como guía para la formación de nuevos axones facilitando de este modo la disminución del núcleo lesivo (Kumamaru et al., 2019). Por tanto, si únicamente el trasplante de NPCs ya tiene efectos regeneradores sobre la lesión, la activación de estas células mediante estimulación optogenética favorecería sus cualidades terapéuticas. Este efecto se comprueba mediante los resultados, según los cuales la fotoestimulación reduce de forma significativa el área de la lesión.

4.6. Limitaciones y perspectivas futuras

Finalmente, con el objetivo de concluir este apartado, me gustaría hacer hincapié en las posibles mejoras y limitaciones del presente proyecto. Los datos aquí presentados son los resultados preliminares del proyecto dado que durante mi TFG no he podido analizar la totalidad de muestras y animales de cada grupo, por lo que aún no se pueden establecer las conclusiones finales acerca del papel de la optogenética sobre la terapia celular en nuestro modelo de LM

En relación a una posible mejora a considerar, para incrementar la eficiencia de la estimulación optogenética *in vivo* se podría emplear otro tipo de opsinas modificadas genéticamente. Aunque en el presente ensayo ya se emplea una ChR2 que presenta un mayor flujo de cationes que el fenotipo original (ChR2-H134R) podrían implementarse otras mutaciones que favorecieran la actividad de dicho canal. Por ejemplo, la mutación L132C incrementa la permeabilidad al calcio lo cual conlleva una mayor sensibilidad a la luz y una cinética más rápida (Kleinlogel et al., 2011). Asimismo, emplear ChRs cuya apertura estuviera provocada por diferente longitud de onda también sería una mejora a tener en cuenta. Este es el caso de ReaChR que constituye una canalrodopsina estimulada por luz roja lejana contando con una mayor penetrancia en el tejido (al ser absorbida esta longitud de onda menos por la sangre en circulación) y una cinética más rápida (Lin et al., 2013).

Por otro lado, el empleo de la estimulación optogenética en médula cuenta con ciertos condicionantes como la limitada penetrancia en el tejido. De hecho, la luz azul empleada en este proyecto no irradia la totalidad de la médula espinal si no únicamente la región dorsal (el dispositivo alcanza una profundidad de 300 μ m) precisándose de radiaciones de mayor intensidad para llegar a todo el tejido lo cual también cuenta con desventajas como la necesidad de un flujo de corriente estable o el calentamiento local del tejido animal (Kathe et al., 2022). No obstante, dado que el trasplante se realiza en dorsal y nuestros datos muestran que las células se sitúan principalmente en esta zona (Figura 14 C) debería tenerse en cuenta, pero no podría destacarse como la limitación principal del trabajo.

En conclusión, a pesar de las limitaciones que presenta este proyecto, la optogenética, al permitir un preciso control espaciotemporal de poblaciones celulares concretas, sigue siendo una buena estrategia para mejorar las cualidades terapéuticas de las células trasplantadas especialmente teniendo en cuenta que, exceptuando la cirugía necesaria para la implantación del sistema de fotoestimulación, constituye un método de fácil aplicación y no invasivo. Asimismo, como se ha visto en el presente proyecto, esta estrategia combinatoria es capaz de favorecer la diferenciación de las NPCs trasplantadas hacia neuronas, atenuar la formación de la cicatriz glial y promover una mayor supervivencia de las células del trasplante.

5. CONCLUSIONES

La lesión medular es una enfermedad debilitante que provoca desmielinización, degeneración axonal y pérdida de sinapsis quedando afectados los pacientes a nivel social, profesional y personal. En la actualidad, existen multitud de estrategias en desarrollo para abordar esta patología destacando sobre ellas la terapia celular. Sin embargo, este abordaje cuenta con limitaciones como la pobre supervivencia celular o la escasa diferenciación de las células trasplantadas. En el presente trabajo se propone la estimulación optogenética como tecnología para afrontar dichos inconvenientes y mejorar las cualidades terapéuticas de las células del trasplante *in vivo*.

El principal objetivo de este proyecto fue estudiar el efecto de la estimulación optogenética *in vivo* sobre los progenitores neurales trasplantados en un modelo subagudo de lesión medular en rata. Partiendo de esta base, las conclusiones extraídas en el presente trabajo son las siguientes:

- La supervivencia de las células del trasplante podría verse afectada por la estimulación optogenética *in vivo* ya que, aunque estos resultados carezcan de significancia estadística, se observan valores mayores en los animales sometidos a fotoestimulación.
- La diferenciación de las NPCs trasplantadas a neuronas se ve incrementada por la fotoestimulación *in vivo*.
- La estimulación optogenética *in vivo* no afecta al cómputo total de la activación celular, aunque sí que parece haber una tendencia al alza en la activación de las NPCs transfectadas y trasplantadas en los animales estimulados.
- La fotoestimulación *in vivo* no parece tener efectos sobre la preservación de las neuronas endógenas tras la lesión.
- La estimulación optogenética *in vivo* reduce el tamaño de la lesión favoreciendo así la recuperación del tejido y disminuyendo el papel inhibitorio de dicha lesión en la recuperación de la médula espinal.

Sin embargo, este procedimiento no finaliza con el presente proyecto, si no que será necesario dedicar más recursos para continuar el análisis del resto de los animales, así como desarrollar nuevas estrategias que mejoren las limitaciones encontradas durante el desarrollo del proceso experimental.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ADLER, A. F., LEE-KUBLI, C., KUMAMARU, H., KADOYA, K., & TUSZYNSKI, M. H. (2017). Comprehensive Monosynaptic Rabies Virus Mapping of Host Connectivity with Neural Progenitor Grafts after Spinal Cord Injury. *Stem Cell Reports*, 8(6), 1525–1533. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.04.004>
- AHUJA, C. S., & 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. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0381>
- AJAY, E., GUNWARDENE, N., & RICHARDSON, R. (2022). Emerging therapies for human hearing loss. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 1–17. <https://doi.org/10.1080/14712598.2022.2072208>
- ALASTRUE-AGUDO, A., ERCEG, S., CASES-VILLAR, M., BISBAL-VELASCO, V., GRIFFETH, R. J., RODRIGUEZ-JIMÉNEZ, F. J., & MORENO-MANZANO, V. (2014). *Experimental Cell Transplantation for Traumatic Spinal Cord Injury Regeneration: Intramedullar or Intrathecal Administration* (pp. 23–35). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1435-7_3
- ALILAIN, W. J., LI, X., HORN, K. P., DHINGRA, R., DICK, T. E., HERLITZE, S., & SILVER, J. (2008). Light-Induced Rescue of Breathing after Spinal Cord Injury. *Journal of Neuroscience*, 28(46), 11862–11870. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3378-08.2008>
- ALIZADEH, A., DYCK, S. M., & KARIMI-ABDOLREZAEI, S. (2019). Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Frontiers in Neurology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00282>
- ANDERSON, K. D., GUEST, J. D., DIETRICH, W. D., BARTLETT BUNGE, M., CURIEL, R., DIDIDZE, M., GREEN, B. A., KHAN, A., PEARSE, D. D., SARAF-LAVI, E., WIDERSTRÖM-NOGA, E., WOOD, P., & LEVI, A. D. (2017). Safety of Autologous Human Schwann Cell Transplantation in Subacute Thoracic Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma*, 34(21), 2950–2963. <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4895>
- ANDERSSON, M., AVALIANI, N., SVENSSON, A., WICKHAM, J., PINBORG, L. H., JESPERSEN, B., CHRISTIANSEN, S. H., BENZON, J., WOLDBYE, D. P. D., & KOKAIA, M. (2016). Optogenetic control of human neurons in organotypic brain cultures. *Scientific Reports*, 6(1), 24818. <https://doi.org/10.1038/srep24818>
- ASGARI, P., ZOLFAGHARI, M., BIT-LIAN, Y., ABDI, A. H., MOHAMMADI, Y., & BAHRAMNEZHAD, F. (2022). Comparison of Hydrocolloid Dressings and Silver Nanoparticles in Treatment of Pressure Ulcers in Patients with Spinal Cord Injuries: A Randomized Clinical Trial. *Journal of Caring Sciences*, 11(1), 1–6. <https://doi.org/10.34172/jcs.2022.08>
- BADHIWALA, J. H., AHUJA, C. S., & FEHLINGS, M. G. (2019). Time is spine: a review of translational advances in spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 30(1), 1–18. <https://doi.org/10.3171/2018.9.SPINE18682>
- BAO, F., & LIU, D. (2002). Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces neuron death and neurological deficits. *Neuroscience*, 115(3), 839–849. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00506-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00506-7)
- BARTUS, K., JAMES, N. D., DIDANGELOS, A., BOSCH, K. D., VERHAAGEN, J., YÁÑEZ-MUÑOZ, R. J., ROGERS, J. H., SCHNEIDER, B. L., MUIR, E. M., & BRADBURY, E. J. (2014). Large-scale chondroitin sulfate proteoglycan digestion with chondroitinase gene therapy leads to reduced pathology and modulates macrophage phenotype following spinal cord contusion injury. *Journal of Neuroscience*, 34(14), 4822–4836. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4369-13.2014>
- BERNSTEIN, J. J., & GOLDBERG, W. J. (1995). Experimental spinal cord transplantation as a mechanism of spinal cord regeneration. *Spinal Cord*, 33(5), 250–253. <https://doi.org/10.1038/sc.1995.57>
- BONILLA, P., HERNANDEZ, J., GIRALDO, E., GONZÁLEZ-PÉREZ, M. A., ALASTRUE-AGUDO, A., ELKHENANY, H., VICENT, M. J., NAVARRO, X., EDEL, M., & MORENO-MANZANO, V. (2021). Human-induced neural and mesenchymal stem cell therapy combined with a curcumin nanoconjugate as a spinal cord injury treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22115966>
- BONNER, J. F., CONNORS, T. M., SILVERMAN, W. F., KOWALSKI, D. P., LEMAY, M. A., & FISCHER, I. (2011). Grafted Neural Progenitors Integrate and Restore Synaptic Connectivity across the Injured Spinal Cord. *Journal of Neuroscience*, 31(12), 4675–4686. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4130-10.2011>

- BOYDEN, E. S., ZHANG, F., BAMBERG, E., NAGEL, G., & DEISSEROTH, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*, 8(9), 1263–1268. <https://doi.org/10.1038/nn1525>
- BRADBURY, E. J., & CARTER, L. M. (2011). Manipulating the glial scar: Chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. *Brain Research Bulletin*, 84(4–5), 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2010.06.015>
- BRYSON, J. B., MACHADO, C. B., CROSSLEY, M., STEVENSON, D., BROS-FACER, V., BURRONE, J., GREENSMITH, L., & LIEBERAM, I. (2014). Optical Control of Muscle Function by Transplantation of Stem Cell-Derived Motor Neurons in Mice. *Science*, 344(6179), 94–97. <https://doi.org/10.1126/science.1248523>
- BURDA, J. E., & SOFRONIEW, M. V. (2014). Reactive Gliosis and the Multicellular Response to CNS Damage and Disease. *Neuron*, 81(2), 229–248. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.034>
- CAJAL, S. R. Y., & MAY, R. M. (1991). *Cajal's Degeneration and Regeneration of the Nervous System* (J. DeFelipe & E. G. Jones, Eds.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195065169.001.0001>
- CHANG, K.-A., KIM, J. W., KIM, J. A., LEE, S., KIM, S., SUH, W. H., KIM, H.-S., KWON, S., KIM, S. J., & SUH, Y.-H. (2011). Biphasic Electrical Currents Stimulation Promotes both Proliferation and Differentiation of Fetal Neural Stem Cells. *PLoS ONE*, 6(4), e18738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018738>
- CHO, T. A. (2015). Spinal Cord Functional Anatomy. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 21, 13–35. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000461082.25876.4a>
- CHOI, D. B., NAM, G., GROH, D. M., SYED, S., FRIDLEY, J. S., & GOKASLAN, Z. L. (2019). Spinal Cord Anatomy. In *Spinal Cord Tumors* (pp. 43–53). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99438-3_3
- COUILLARD-DESPRES, S., BIELER, L., & VOGL, M. (2017). Pathophysiology of Traumatic Spinal Cord Injury. In *Neurological Aspects of Spinal Cord Injury* (pp. 503–528). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46293-6_19
- COURTINE, G., & SOFRONIEW, M. V. (2019). Spinal cord repair: advances in biology and technology. In *Nature Medicine*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0475-6>
- CURT, A., HSIEH, J., SCHUBERT, M., HUPP, M., FRIEDL, S., FREUND, P., HUBER, E., PFYFFER, D., SUTTER, R., JUTZELER, C., WÜTHRICH, R. P., MIN, K., CASHA, S., FEHLINGS, M., & GUZMAN, R. (2019). Safety and Preliminary Efficacy of Allogeneic Neural Stem Cell Transplantation in Chronic Spinal Cord Injury: A Translational Phase I/IIa Trial. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3335037>
- DAADI, M. M., KLAUSNER, J. Q., BAJAR, B., GOSHEN, I., LEE-MESSER, C., LEE, S. Y., WINGE, M. C. G., RAMAKRISHNAN, C., LO, M., SUN, G., DEISSEROTH, K., & STEINBERG, G. K. (2016). Optogenetic Stimulation of Neural Grafts Enhances Neurotransmission and Downregulates the Inflammatory Response in Experimental Stroke Model. *Cell Transplantation*, 25(7), 1371–1380. <https://doi.org/10.3727/096368915X688533>
- DE FEO, D., MERLINI, A., LATERZA, C., & MARTINO, G. (2012). Neural stem cell transplantation in central nervous system disorders. *Current Opinion in Neurology*, 25(3), 322–333. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e328352ec45>
- DONNELLY, D. J., & POPOVICH, P. G. (2008). Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 209(2), 378–388. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.06.009>
- DOUGHERTY, B. J., GONZALEZ-ROTHI, E. J., LEE, K. Z., ROSS, H. H., REIER, P. J., & FULLER, D. D. (2016). Respiratory outcomes after mid-cervical transplantation of embryonic medullary cells in rats with cervical spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 278, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.01.017>
- DULIN, J. N., KAROLY, E. D., WANG, Y., STROBEL, H. W., & GRILL, R. J. (2013). Licofelone Modulates Neuroinflammation and Attenuates Mechanical Hypersensitivity in the Chronic Phase of Spinal Cord Injury. *Journal of Neuroscience*, 33(2), 652–664. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6128-11.2013>
- EVANS, T. A., BARKAUSKAS, D. S., MYERS, J. T., HARE, E. G., YOU, J. Q., RANSOHOFF, R. M., HUANG, A. Y., & SILVER, J. (2014). High-resolution intravital imaging reveals that blood-derived macrophages but not resident microglia facilitate secondary axonal dieback in traumatic spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 254, 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.01.013>

- FEHLINGS, M. G., TETREAULT, L. A., WILSON, J. R., KWON, B. K., BURNS, A. S., MARTIN, A. R., HAWRYLUK, G., & HARROP, J. S. (2017). A Clinical Practice Guideline for the Management of Acute Spinal Cord Injury: Introduction, Rationale, and Scope. *Global Spine Journal*, 7(3_suppl), 84S-94S. <https://doi.org/10.1177/2192568217703387>
- FENNO, L. E., MATTIS, J., RAMAKRISHNAN, C., HYUN, M., LEE, S. Y., HE, M., TUCCIARONE, J., SELIMBEYOGLU, A., BERNDT, A., GROSENICK, L., ZALOCUSKY, K. A., BERNSTEIN, H., SWANSON, H., PERRY, C., DIESTER, I., BOYCE, F. M., BASS, C. E., NEVE, R., HUANG, Z. J., & DEISSEROTH, K. (2014). Targeting cells with single vectors using multiple-feature Boolean logic. *Nature Methods*, 11(7), 763–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2996>
- FISCHER, I., DULIN, J. N., & LANE, M. A. (2020). Transplanting neural progenitor cells to restore connectivity after spinal cord injury. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 21, Issue 7, pp. 366–383). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0314-2>
- GALIEVA, L. R., JAMES, V., MUKHAMEDSHINA, Y. O., & RIZVANOV, A. A. (2019). Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles for the Treatment of Nerve Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00163>
- GANAU, M., ZEUWUDE, R., & FEHLINGS, M. G. (2019). Functional Anatomy of the Spinal Cord. In *Degenerative Cervical Myelopathy and Radiculopathy* (pp. 3–12). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-97952-6_1
- GIRALDO, E., PALMERO-CANTON, D., MARTINEZ-ROJAS, B., SANCHEZ-MARTIN, M. D. M., & MORENO-MANZANO, V. (2021). Optogenetic modulation of neural progenitor cells improves neuroregenerative potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms22010365>
- GOGGINS, E., MITANI, S., & TANAKA, S. (2022). Clinical perspectives on vagus nerve stimulation: present and future. *Clinical Science*, 136(9), 695–709. <https://doi.org/10.1042/CS20210507>
- GURU, A., POST, R. J., HO, Y. Y., & WARDEN, M. R. (2015). Making sense of optogenetics. In *International Journal of Neuropsychopharmacology* (Vol. 18, Issue 11). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv079>
- GUSEL'NIKOVA, V. V., & KORZHEVSKIY, D. E. (n.d.). NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, 7(2), 42–47.
- HILL, C. E., BEATTIE, M. S., & BRESNAHAN, J. C. (2001). Degeneration and Sprouting of Identified Descending Supraspinal Axons after Contusive Spinal Cord Injury in the Rat. *Experimental Neurology*, 171(1), 153–169. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7734>
- HOULÉ, J. D., & REIER, P. J. (1988). Transplantation of fetal spinal cord tissue into the chronically injured adult rat spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*, 269(4), 535–547. <https://doi.org/10.1002/cne.902690406>
- IKEGAMI, T., NAKAMURA, M., YAMANE, J., KATOH, H., OKADA, S., IWANAMI, A., WATANABE, K., ISHII, K., KATO, F., FUJITA, H., TAKAHASHI, T., OKANO, H. J., TOYAMA, Y., & OKANO, H. (2005). Chondroitinase ABC combined with neural stem/progenitor cell transplantation enhances graft cell migration and outgrowth of growth-associated protein-43-positive fibers after rat spinal cord injury. *European Journal of Neuroscience*, 22(12), 3036–3046. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04492.x>
- JIN, Y., BOUYER, J., SHUMSKY, J. S., HAAS, C., & FISCHER, I. (2016). Transplantation of neural progenitor cells in chronic spinal cord injury. *Neuroscience*, 320, 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.066>
- KADOYA, K., LU, P., NGUYEN, K., LEE-KUBLI, C., KUMAMARU, H., YAO, L., KNACKERT, J., POPLAWSKI, G., DULIN, J. N., STROBL, H., TAKASHIMA, Y., BIANE, J., CONNER, J., ZHANG, S.-C., & TUSZYNSKI, M. H. (2016). Spinal cord reconstitution with homologous neural grafts enables robust corticospinal regeneration. *Nature Medicine*, 22(5), 479–487. <https://doi.org/10.1038/nm.4066>
- KAHL, C. R., & MEANS, A. R. (2003). Regulation of Cell Cycle Progression by Calcium/Calmodulin-Dependent Pathways. *Endocrine Reviews*, 24(6), 719–736. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0008>
- KANTOR, B., BAILEY, R. M., WIMBERLY, K., KALBURGI, S. N., & GRAY, S. J. (2014). *Methods for Gene Transfer to the Central Nervous System* (pp. 125–197). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800149-3.00003-2>
- KARIMI-ABDOLREZAEI, S., & BILLAKANTI, R. (2012). Reactive Astroglia after Spinal Cord Injury—Beneficial and Detrimental Effects. *Molecular Neurobiology*, 46(2), 251–264. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8287-4>

- KATHE, C., MICHOU, F., SCHÖNLE, P., ROWALD, A., BRUN, N., RAVIER, J., FURFARO, I., PAGGI, V., KIM, K., SOLOUKEY, S., ASBOTH, L., HUTSON, T. H., JELESCU, I., PHILIPPIDES, A., ALWAHAB, N., GANDAR, J., HUBER, D., DE ZEEUW, C. I., BARRAUD, Q., ... COURTINE, G. (2022). Wireless closed-loop optogenetics across the entire dorsoventral spinal cord in mice. *Nature Biotechnology*, *40*(2), 198–208. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01019-x>
- KATOH, H., YOKOTA, K., & FEHLINGS, M. G. (2019). Regeneration of spinal cord connectivity through stem cell transplantation and biomaterial scaffolds. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00248>
- KE, Y., CHI, L., XU, R., LUO, C., GOZAL, D., & LIU, R. (2006). Early Response of Endogenous Adult Neural Progenitor Cells to Acute Spinal Cord Injury in Mice. *Stem Cells*, *24*(4), 1011–1019. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0249>
- KIM, W. R., KANG, M., PARK, H., HAM, H. J., LEE, H., & GEUM, D. (2017). Functional Test Scales for Evaluating Cell-Based Therapies in Animal Models of Spinal Cord Injury. In *Stem Cells International* (Vol. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/5160261>
- KLEINLOGEL, S., FELDBAUER, K., DEMPSKI, R. E., FOTIS, H., WOOD, P. G., BAMANN, C., & BAMBERG, E. (2011). Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca²⁺-permeable channelrhodopsin CatCh. *Nature Neuroscience*, *14*(4), 513–518. <https://doi.org/10.1038/nn.2776>
- KO, H.-Y. (2019). Biomechanics and Pathophysiology of Spinal Cord Injuries. In *Management and Rehabilitation of Spinal Cord Injuries* (pp. 73–80). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7033-4_5
- KOBELT, L. J., WILKINSON, A. E., MCCORMICK, A. M., WILLITS, R. K., & LEIPZIG, N. D. (2014). Short Duration Electrical Stimulation to Enhance Neurite Outgrowth and Maturation of Adult Neural Stem Progenitor Cells. *Annals of Biomedical Engineering*, *42*(10), 2164–2176. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1058-9>
- KODAMA, T., GUERRERO, S., SHIN, M., MOGHADAM, S., FAULSTICH, M., & DU LAC, S. (2012). Neuronal Classification and Marker Gene Identification via Single-Cell Expression Profiling of Brainstem Vestibular Neurons Subserving Cerebellar Learning. *Journal of Neuroscience*, *32*(23), 7819–7831. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0543-12.2012>
- KOFFLER, J., ZHU, W., QU, X., PLATOSHYN, O., DULIN, J. N., BROCK, J., GRAHAM, L., LU, P., SAKAMOTO, J., MARSALA, M., CHEN, S., & TUSZYNSKI, M. H. (2019). Biomimetic 3D-printed scaffolds for spinal cord injury repair. *Nature Medicine*, *25*(2), 263–269. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0296-z>
- KUMAMARU, H., LU, P., ROSENZWEIG, E. S., KADOYA, K., & TUSZYNSKI, M. H. (2019). Regenerating Corticospinal Axons Innervate Phenotypically Appropriate Neurons within Neural Stem Cell Grafts. *Cell Reports*, *26*(9), 2329–2339.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.099>
- LATTARD, A., POULEN, G., BARTOLAMI, S., GERBER, Y. N., & PERRIN, F. E. (2021). Negative Impact of Sigma-1 Receptor Agonist Treatment on Tissue Integrity and Motor Function Following Spinal Cord Injury. *Frontiers in Pharmacology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.614949>
- LEE, K.-Z., LANE, M. A., DOUGHERTY, B. J., MERCIER, L. M., SANDHU, M. S., SANCHEZ, J. C., REIER, P. J., & FULLER, D. D. (2014). Intraspinal transplantation and modulation of donor neuron electrophysiological activity. *Experimental Neurology*, *251*, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.10.016>
- LEPSKI, G., JANNES, C. E., NIKKHAH, G., & BISCHOFBERGER, J. (2013). cAMP promotes the differentiation of neural progenitor cells in vitro via modulation of voltage-gated calcium channels. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00155>
- LIN, J., KNUTSEN, P., MULLER, A. (2013) ReaChR: a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation. *Nat Neurosci* *16*, 1499–1508. <https://doi.org/10.1038/nn.3502>
- LONZE, B. E., & GINTY, D. D. (2002). Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron*, *35*(4), 605–623. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00828-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00828-0)
- LU, P., WANG, Y., GRAHAM, L., MCHALE, K., GAO, M., WU, D., BROCK, J., BLESCH, A., ROSENZWEIG, E. S., HAVTON, L. A., ZHENG, B., CONNER, J. M., MARSALA, M., & TUSZYNSKI, M. H. (2012). Long-Distance Growth and Connectivity of Neural Stem Cells after Severe Spinal Cord Injury. *Cell*, *150*(6), 1264–1273. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.020>
- LU, T., PENG, W., LIANG, Y., LI, M., LI, D.-S., DU, K.-H., ZHU, J.-H., & WU, J.-H. (2020). PTEN-silencing combined with ChABC-overexpression in adipose-derived stem cells promotes functional recovery of spinal

- cord injury in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 532(3), 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.08.085>
- MARTENS, D. J., SEABERG, R. M., & VAN DER KOOY, D. (2002). *In vivo* infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, 16(6), 1045–1057. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02181.x>
- MORGAN, J. I., & CURRAN, T. (1991). *Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes Fos and Jun*. www.annualreviews.org
- MOTHE, A. J., & TATOR, C. H. (2013). Review of transplantation of neural stem/progenitor cells for spinal cord injury. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 31(7), 701–713. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.07.004>
- NIKONOV, S., ARAVAND, P., LYUBARSKY, A., NIKONOV, R., LUO, A. J., WEI, Z., MAGUIRE, A. M., PHELPS, N. T., SHPYLCHAK, I., WILLETT, K., ALEMAN, T. S., HUCKFELDT, R. M., RAMACHANDRAN, P. S., & BENNETT, J. (2022). Restoration of Vision and Retinal Responses After Adeno-Associated Virus–Mediated Optogenetic Therapy in Blind Dogs. *Translational Vision Science & Technology*, 11(5), 24. <https://doi.org/10.1167/tvst.11.5.24>
- NORENBERG, M. D., SMITH, J., & MARCILLO, A. (2004). The Pathology of Human Spinal Cord Injury: Defining the Problems. *Journal of Neurotrauma*, 21(4), 429–440. <https://doi.org/10.1089/089771504323004575>
- ORDAZ, J. D., WU, W., & XU, X. M. (2017). Optogenetics and its application in neural degeneration and regeneration. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 12, Issue 8, pp. 1197–1209). Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.213532>
- O’SHEA, T. M., BURDA, J. E., & SOFRONIEW, M. V. (2017). Cell biology of spinal cord injury and repair. *Journal of Clinical Investigation*, 127(9), 3259–3270. <https://doi.org/10.1172/JCI90608>
- OYINBO, C. A. (2011). Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 71(2), 281–299.
- PINEAU, I., & LACROIX, S. (2007). Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: Multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *The Journal of Comparative Neurology*, 500(2), 267–285. <https://doi.org/10.1002/cne.21149>
- PRZEKORA, A., & JUSZKIEWICZ, L. (2020). The Effect of Autologous Adipose Tissue–Derived Mesenchymal Stem Cells’ Therapy in the Treatment of Chronic Posttraumatic Spinal Cord Injury in a Domestic Ferret Patient. *Cell Transplantation*, 29, 096368972092898. <https://doi.org/10.1177/0963689720928982>
- QIU, G., ZHENG, G., GE, M., WANG, J., HUANG, R., SHU, Q., & XU, J. (2019). Functional proteins of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 359. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1484-6>
- REIER, P. J., BREGMAN, B. S., & WUJEK, J. R. (1986). Intraspinal transplantation of embryonic spinal cord tissue in neonatal and adult rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 247(3), 275–296. <https://doi.org/10.1002/cne.902470302>
- RENZ, M., VERRIER, B., KURZ, C., & MÜLLER, R. (1987). Chromatin association and DNA binding properties of the c-*fos* proto-oncogene product. *Nucleic Acids Research*, 15(1), 277–292. <https://doi.org/10.1093/nar/15.1.277>
- RICHARDSON, P. M., MCGUINNESS, U. M., & AGUAYO, A. J. (1982). Peripheral nerve autografts to the rat spinal cord: Studies with axonal tracing methods. *Brain Research*, 237(1), 147–162. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90563-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90563-7)
- ROWLAND, J. W., HAWRYLUK, G. W. J., KWON, B., & FEHLINGS, M. G. (2008). Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurgical Focus*, 25(5), E2. <https://doi.org/10.3171/FOC.2008.25.11.E2>
- RYABOV, S. I., ZVYAGINTSEVA, M. A., YADGAROV, M. YA., BAZANOVICH, S. A., & SMIRNOV, V. A. (2020). Comparison of the Efficiency of Systemic and Local Cell Therapy with Human Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells in Rats with Severe Spinal Cord Injury. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 168(4), 552–555. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04751-7>

- SAMBUCETTI, L. C., & CURRAN, T. (1986). The Fos Protein Complex Is Associated with DNA in Isolated Nuclei and Binds to DNA Cellulose. *Science*, 234(4782), 1417–1419. <https://doi.org/10.1126/science.3491427>
- SAMINENI, V. K., YOON, J., CRAWFORD, K. E., JEONG, Y. R., MCKENZIE, K. C., SHIN, G., XIE, Z., SUNDARAM, S. S., LI, Y., YANG, M. Y., KIM, J., WU, D., XUE, Y., FENG, X., HUANG, Y., MICKLE, A. D., BANKS, A., HA, J. S., GOLDEN, J. P., ... GEREAU, R. W. (2017). Fully implantable, battery-free wireless optoelectronic devices for spinal optogenetics. *Pain*, 158(11), 2108–2116. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000968>
- SANKAVARAM, S. R., HAKIM, R., COVACU, R., FROSTELL, A., NEUMANN, S., SVENSSON, M., & BRUNDIN, L. (2019). Adult Neural Progenitor Cells Transplanted into Spinal Cord Injury Differentiate into Oligodendrocytes, Enhance Myelination, and Contribute to Recovery. *Stem Cell Reports*, 12(5), 950–966. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.03.013>
- SAREMI, J., MAHMOODI, N., RASOULI, M., RANJBAR, F. E., MAZAHERI, E. L., AKBARI, M., HASANZADEH, E., & AZAMI, M. (2022). Advanced approaches to regenerate spinal cord injury: The development of cell and tissue engineering therapy and combinational treatments. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 146). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112529>
- SCHMIDLEY, J. W. (1990). Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke*, 21(7), 1086–1090. <https://doi.org/10.1161/01.STR.21.7.1086>
- SELZER, M., CLARKE, S., COHEN, L., KWAKKEL, G., & MILLER, R. (2014). *Neural Repair and Rehabilitation*. Cambridge University Press.
- SETOYAMA, C., FRUNZIO, R., LIAU, G., MUDRYJ, M., & DE CROMBRUGGHE, B. (1986). Transcriptional activation encoded by the v-fos gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(10), 3213–3217. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3213>
- SHANG, A.-J., HONG, S.-Q., XU, Q.-, WANG, H.-Y., YANG, Y., WANG, Z.-F., XU, B.-N., JIANG, X.-D., & XU, R.-X. (2011). NT-3-secreting human umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantation for the treatment of acute spinal cord injury in rats. *Brain Research*, 1391, 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.03.019>
- SHIRIAN, S., EBRAHIMI-BAROUGH, S., SABERI, H., NOROUZI-JAVIDAN, A., MOUSAVI, S. M. M., DERAKHSHAN, M. A., ARJMAND, B., & AI, J. (2016). Comparison of Capability of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Endometrial Stem Cells to Differentiate into Motor Neurons on Electrospun Poly(ε-caprolactone) Scaffold. *Molecular Neurobiology*, 53(8), 5278–5287. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9442-5>
- SOFRONIEW, M. V. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(5), 249–263. <https://doi.org/10.1038/nrn3898>
- SOFRONIEW, M. V. (2018). Dissecting spinal cord regeneration perspective. In *Nature* (Vol. 557, Issue 7705, pp. 343–350). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0068-4>
- SPRUANCE, V. M., ZHOLUDEVA, L. V., HORMIGO, K. M., RANDELMAN, M. L., BEZDUDNAYA, T., MARCHENKO, V., & LANE, M. A. (2018). Integration of Transplanted Neural Precursors with the Injured Cervical Spinal Cord. *Journal of Neurotrauma*, 35(15), 1781–1799. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5451>
- STAIGER, J. F., MASANNECK, C., BISLER, S., SCHLEICHER, A., ZUSCHRATTER, W., & ZILLES, K. (2002). Excitatory and inhibitory neurons express c-Fos in barrel-related columns after exploration of a novel environment. *Neuroscience*, 109(4), 687–699. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00501-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00501-2)
- STROH, A., TSAI, H.-C., WANG, L.-P., ZHANG, F., KRESSEL, J., ARAVANIS, A., SANTHANAM, N., DEISSEROTH, K., KONNERTH, A., & SCHNEIDER, M. B. (2011). Tracking Stem Cell Differentiation in the Setting of Automated Optogenetic Stimulation. *Stem Cells*, 29(1), 78–88. <https://doi.org/10.1002/stem.558>
- TIAN, D., DONG, Q., PAN, D., HE, Y., YU, Z., XIE, M., & WANG, W. (2007). Attenuation of astrogliosis by suppressing of microglial proliferation with the cell cycle inhibitor olomoucine in rat spinal cord injury model. *Brain Research*, 1154, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.04.005>
- TISCHER, D., & WEINER, O. D. (2014). Illuminating cell signalling with optogenetic tools. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 551–558. <https://doi.org/10.1038/nrm3837>

- TODD, A. J., SPIKE, R. C., BRODBELT, A. R., PRICE, R. F., & SHEHAB, S. A. S. (1994). Some inhibitory neurons in the spinal cord develop c-fos-immunoreactivity after noxious stimulation. *Neuroscience*, *63*(3), 805–816. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90525-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90525-8)
- TOETTCHER, J. E., WEINER, O. D., & LIM, W. A. (2013). Using Optogenetics to Interrogate the Dynamic Control of Signal Transmission by the Ras/Erk Module. *Cell*, *155*(6), 1422–1434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.004>
- CURRAN, A., MILLER, D., ZOKAS, L., & VERMA, I. M. (1984). Viral and cellular fos proteins: A comparative analysis. *Cell*, *36*(2), 259–268. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90219-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90219-8)
- TOMER, R., YE, L., HSUEH, B., & DEISSEROTH, K. (2014). Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nature Protocols*, *9*(7), 1682–1697. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.123>
- TORTORA, G. J., & DERRICKSON, B. (2006). *Principios de Anatomía y Fisiología* (13ª Edición). Panamericana.
- TRIPATHI, P., & SIEBER, F. (2020). The Adult Central Nervous System: Anatomy and Physiology. In *Essentials of Neurosurgical Anesthesia & Critical Care* (pp. 3–13). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-17410-1_1
- TSUJI, O., SUGAI, K., YAMAGUCHI, R., TASHIRO, S., NAGOSHI, N., KOHYAMA, J., IIDA, T., OHKUBO, T., ITAKURA, G., ISODA, M., SHINOZAKI, M., FUJIYOSHI, K., KANEMURA, Y., YAMANAKA, S., NAKAMURA, M., & OKANO, H. (2019). Concise Review: Laying the Groundwork for a First-In-Human Study of an Induced Pluripotent Stem Cell-Based Intervention for Spinal Cord Injury. *Stem Cells*, *37*(1), 6–13. <https://doi.org/10.1002/stem.2926>
- VENKATESH, K., GHOSH, S. K., MULLICK, M., MANIVASAGAM, G., & SEN, D. (2019). Spinal cord injury: pathophysiology, treatment strategies, associated challenges, and future implications. *Cell and Tissue Research*, *377*(2), 125–151. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03039-1>
- WARDEN, M. R., CARDIN, J. A., & DEISSEROTH, K. (2014). Optical Neural Interfaces. *Annual Review of Biomedical Engineering*, *16*(1), 103–129. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-104733>
- WHITE, T. E., LANE, M. A., SANDHU, M. S., O’STEEN, B. E., FULLER, D. D., & REIER, P. J. (2010). Neuronal progenitor transplantation and respiratory outcomes following upper cervical spinal cord injury in adult rats. *Experimental Neurology*, *225*(1), 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.06.006>
- WILCOX, J. T., SATKUNENDRARAJAH, K., NASIRZADEH, Y., LALIBERTE, A. M., LIP, A., CADOTTE, D. W., FOLTZ, W. D., & FEHLINGS, M. G. (2017). Generating level-dependent models of cervical and thoracic spinal cord injury: Exploring the interplay of neuroanatomy, physiology, and function. *Neurobiology of Disease*, *105*, 194–212. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.05.009>
- XU, W., CHI, L., XU, R., KE, Y., LUO, C., CAI, J., QIU, M., GOZAL, D., & LIU, R. (2005). Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal Cord*, *43*(4), 204–213. <https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101674>
- YOKOTA, K., KOBAYAKAWA, K., KUBOTA, K., MIYAWAKI, A., OKANO, H., OHKAWA, Y., IWAMOTO, Y., & OKADA, S. (2015). Engrafted Neural Stem/Progenitor Cells Promote Functional Recovery through Synapse Reorganization with Spared Host Neurons after Spinal Cord Injury. *Stem Cell Reports*, *5*(2), 264–277. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.06.004>
- YU, S. P., TUNG, J. K., WEI, Z. Z., CHEN, D., BERGLUND, K., ZHONG, W., ZHANG, J. Y., GU, X., SONG, M., GROSS, R. E., LIN, S. Z., & WEI, L. (2019). Optochemogenetic Stimulation of Transplanted iPS-NPCs Enhances Neuronal Repair and Functional Recovery after Ischemic Stroke. *The Journal of Neuroscience*, *39*(33), 6571–6594. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2010-18.2019>
- ZHANG, F., GRADINARU, V., ADAMANTIDIS, A. R., DURAND, R., AIRAN, R. D., DE LECEA, L., & DEISSEROTH, K. (2010). Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nature Protocols*, *5*(3), 439–456. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.226>
- ZHANG, L., ZHUANG, X., CHEN, Y., & XIA, H. (2019). Intravenous transplantation of olfactory bulb ensheathing cells for a spinal cord hemisection injury rat model. *Cell Transplantation*, *28*(12), 1585–1602. <https://doi.org/10.1177/0963689719883842>
- ZHANG, Z., JING, Y., MA, Y., DUAN, D., LI, B., HÖLSCHER, C., LI, C., WEI, J., GAO, A., SHANG, L., TAO, F., & XING, Y. (2020). Driving GABAergic neurons optogenetically improves learning, reduces amyloid load and

enhances autophagy in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 525(4), 928–935. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.004>

ZHAO, S., TING, J. T., ATALLAH, H. E., QIU, L., TAN, J., GLOSS, B., AUGUSTINE, G. J., DEISSEROTH, K., LUO, M., GRAYBIEL, A. M., & FENG, G. (2011). Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nature Methods*, 8(9), 745–752. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1668>

ZHOLUDEVA, L. V., IYER, N., QIANG, L., SPRUANCE, V. M., RANDELMAN, M. L., WHITE, N. W., BEZDUDNAYA, T., FISCHER, I., SAKIYAMA-ELBERT, S. E., & LANE, M. A. (2018). Transplantation of Neural Progenitors and V2a Interneurons after Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma*, 35(24), 2883–2903. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5439>

Zhu, P. (2009). Optogenetic dissection of neuronal circuits in zebrafish using viral gene transfer and the Tet system. *Frontiers in Neural Circuits*, 3. <https://doi.org/10.3389/neuro.04.021.2009>