UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Terapia Celular Asistida por Hidrogeles de Fibroína en un Modelo Experimental de Ictus Cerebral

Tesis doctoral de:
Laura Fernández García

Bajo la dirección de:
Daniel González Nieto

Madrid, 2017.

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE TELECOMUNICACIÓN

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA FOTÓNICA Y BIOINGENIERÍA

AUTORIZACIÓN PARA LA DEFENSA DE LA TESIS DOCTORAL

D. Daniel González Nieto, Profesor e Investigador de la Universidad Politécnica de Madrid,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado: **“Terapia Celular Asistida por Hidrogeles de Fibroína en un Modelo Experimental de Ictus Cerebral”**, ha sido realizado bajo mi dirección y supervisión por la doctoranda Dña. Laura Fernández García, licenciada en Biotecnología por la Universidad de León.

Este trabajo reúne las condiciones de calidad y rigor científico para ser presentado y defendido como Tesis en opción al Grado Científico de Doctor.

En Madrid, 27 de Octubre de 2017.

Fdo. Dr. Daniel González Nieto

A mi hermano, y a mis padres

En primer lugar, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, D. Daniel González Nieto, por confiar en mí desde el primer momento, y darme la valiosa oportunidad de emprender mi camino en este bonito, pero a la vez tan duro, mundo de la ciencia. Por trasladarme su pasión, perseverancia y paciencia. Gracias.

Al D. Francisco del Pozo Guerrero, artífice y coordinador del proyecto Neurotec (PROYECTO DE LA COMUNIDAD DE MADRID. NEUROTEC S2010/BMD-2460), gracias al cual hemos podido desarrollar el presente trabajo de Tesis, así como por su labor en la implementación del programa de Doctorado en Ingeniería Biomédica. Al catedrático y actual director del Centro de Tecnología Biomédica (CTB) D. Gustavo Víctor Guinea Tortuero, así como al Profesor y gran investigador José Pérez Rigueiro, líderes del Laboratorio de biomateriales del CTB, por ser parte integrante de este proyecto, así como por sus aportaciones e implicación directa en el desarrollo de esta Tesis. A la Dra. Nuria Mari Buyé por el desarrollo del biomaterial empleado y ser piedra angular tanto en lo profesional como en lo personal. Al director del Equipo de Biotecnología IMIDA, en Murcia, por su generosa aportación de capullos de seda.

Al Dr. Ricardo Martínez Murillo, responsable del Grupo de Investigación Neurovascular y director del Instituto Cajal, y a la excelente profesional, Soledad Martínez Montero, por acercarme, desde su extensa experiencia, a la bellísima disciplina de la histología y sin los que no hubiese sido posible el desarrollo del modelo experimental empleado. Gracias.

Al Dr. Luis Carlos Barrio Calvo y José María Gaztelu Quijano, del departamento de investigación del hospital Ramón y Cajal, al frente del Grupo Neurobiología Experimental, por la cesión de equipos y mostrarme desde cerca la electrofisiología. Gracias también, por tantos buenos momentos compartidos y por esas comidas de navidad que se extendían en compañía de Paloma, José Luis, María, Adela, Ilaria, Leo, Juan, y hacerme sentir parte de esa gran familia. Al servicio de inmunología celular del Hospital Ramón y Cajal, y en concreto a la Dra. Eulalia Rodríguez Martín, al Dr. Carlos Paíno Belarrinaga, Facultativo del Departamento de Investigación del Hospital Ramón y Cajal, Irene Sendiña Nadal, del laboratorio de Redes Biológicas del CTB, por permitirnos utilizar sus instalaciones. Al Dr. Masaru Okabe (Universidad de Osaka, Japón), y el Dr. Jose Carlos Segovia (CIEMAT), por donarnos generosamente los ratones C57BL/6J-Tg(CAG-EGFP) imprescindibles para el desarrollo del proyecto. A la Dra. Milagros Ramos Gómez al frente del Laboratorio de bioquímica y biofuncionalización, de la unidad de Neurología Experimental, por su inestimable apoyo a lo largo de estos años, tanto en lo profesional como en lo personal. Gracias.

Al Dr. Javier de Felipe Oroquieta, responsable y alma del Laboratorio de Circuitos Corticales del Instituto Cajal, y a la Dra. Pilar Flores Romero, por darme la oportunidad de formar parte de un gran equipo humano de profesionales como el suyo. Gracias.

A los compañeros nuevos y los no tan nuevos, a todos los que me habéis acompañado durante estos años, Mar, Ana, Tino, Fer, Blanca, Ricardo (primo), Oscar, Lorena, Isa, Ana, Asta, Miriam, Lore, Carmen, Debora, Mamen, Silvia, Sandra, Alberto, Rodrigo, Ángel, Lidia A., Lida B., Diana S., Ruth, Marta T., Marta D., Marta M., Andrea, Guille, Alex, Montse, Rodrigo, Rafa, Ángel, Loren, M^a Jesús, Roció (seguro que se me escapa alguien...), gracias por haber compartido ratos dentro o fuera del CTB.

Gracias a los que hace cinco años empezaron como compañeros, y ahora formáis parte de mi pequeño mundo. A Nuria, María y Javi, porque al son de “conozco un bar” se han fraguado muuuuchas noches imborrables, conciertos, calçotadas y bbq veganas. Gracias amigos. A Leo, Adela e Ilaria, gracias por acogerme como a una más en el HRYC. A Pilar, Diana, Yago y Laura por aguantarme en esta última y dura etapa, por los “torneos” de pádel que acaban en cañas, por las noches de verano en el parquecito, por todos los momentos compartidos y los que están por venir, por darme tanto cariño. A Luidmila, por sus historias que amenizaba las largas tardes de trabajo. A Sole y Juan, hermana y “padre” (cuando toca) durante estos años, sin vosotros no lo habría conseguido. Gracias por tantos momentos y “falcons” compartidos, por los ratos de patines, bolos, karaoke y brindis... Gracias por todo lo que me habéis enseñado a lo largo de estos maravillosos años juntos, gracias por estar en las buenas y en las malas, por los días que se convirtieron en tardes y las tardes en largas noches. No imagino mejores compañeros de viaje.

En definitiva, gracias a todos aquellos que habéis compartido conmigo esta etapa.

A mis Biolobas. Lau, Marti, Anilla, Rosa, Galle, Jiris, Sari, Miri. Porque todo esto empiezo con vosotras hace ya “algunos” años, con largas tardes y noches de “estudio” en el albéitar, “machacaos”, espichas, viajes, despedidas, reencuentros, fiestas, disfraces, alegrías, y muuuuuchas risas... Gracias por seguir a mi lado y darme siempre vuestro cariño, demostrándome, día a día, que la distancia se puede salvar a golpe de telefonazo. A “mi chica”, porque esta experiencia no hubiese sido lo mismo sin ti, amiga, hermana y madre, gracias Lau. A mis masqueperras, las incondicionales, las de siempre...Ele San y Lau, gracias. A Vero, Bego, Alba, Soni y Eva, porque en estos años hemos compartido muchos momentos inolvidables, y los que nos quedan. A mi Yurufis, porque lo que empezó en una fiesta de disfraces, hoy se ha convertido para mí en una amistad imprescindible en mi vida, gracias por las largas noches arreglando el mundo y meneando las caderas. A mi Cuñi, porque eres pura energía positiva, porque me encanta que nos equivoquemos de tren por estar bailando, porque eres genial!! A tí, por soportarme durante los años más duros de este proceso, por tu apoyo y amor incondicional, tu paciencia, tus ánimos, y por sentirte siempre tan orgulloso de mí. Por arroparme en los momentos más difíciles. Gracias Iñaki.

A mis padres. Gracias por inculcarme vuestra capacidad de lucha y afán de superación, por hacerme ser tan terca en todo lo que emprendo, gracias por vuestra ayuda incondicional y sin límites, gracias por aguantarme cuando ni yo misma lo hacía, gracias por ser un ejemplo...me habéis dejado el listón muy alto.

Al responsable de que hoy esté donde esté, a la persona que siempre ha estado acompañándome en el camino, celebrando mis logros, y dándome energía para continuar cuando las fuerzas flaqueaban, mi modelo a seguir, mi mejor amigo, mi hermano. Simplemente gracias tatito. Te quiero!!

RESUMEN:

El ictus es una de las principales causas de discapacidad (incluida la parálisis) y deterioro cognitivo en adultos, y la segunda causa de defunción a nivel mundial, detrás de la cardiopatía isquémica. Se estima que un 25-53 % de los pacientes con ictus presentan, durante al menos 6 meses después del accidente cerebrovascular, dependencia para la realización de al menos una tarea cotidiana, ocasionando incalculables costes personales, familiares y sociales. En la actualidad, no existen terapias eficaces que reparen el tejido cerebral dañado y promuevan un grado satisfactorio de recuperación funcional en los pacientes. Entre los diferentes enfoques experimentales examinados en las últimas décadas, la terapia celular se ha configurado como una opción viable para restaurar las áreas dañadas del cerebro; con la formación de nuevo tejido cerebral derivado de las células exógenas trasplantadas o/y mediante la estimulación de los mecanismos endógenos de reparación cerebral. La relevancia de este enfoque se ha visto incrementada en la última década, con una expansión progresiva del número de ensayos clínicos realizados en pacientes con daño cerebral a los que se han realizado implantes de diversas poblaciones celulares por vía sistémica e intra-cerebral. El trasplante combinado de células terapéuticas y distintos biomateriales para incrementar la viabilidad de los injertos celulares, constituye una estrategia prometedora en plena fase de expansión. Debido a la peculiar estructura físico-química, así como a los módulos de rigidez cercanos a los tejidos blandos como el cerebro, los hidrogeles se presentan como un grupo muy versátil e interesante de andamios estructurales para la encapsulación celular y la reconstrucción cerebral. En el presente trabajo, mostramos un novedoso enfoque terapéutico basado en el implante combinado de células madre mesenquimales e hidrogeles de fibroína de la seda como soporte para el tratamiento del accidente cerebrovascular. Por un lado, se ha demostrado la inocuidad y tolerabilidad de este biomaterial con el tejido cerebral y su funcionalidad, así como su capacidad para favorecer el injerto celular tras el implante cerebral. Por otro lado, en un modelo experimental de accidente cerebrovascular en el ratón, se ha demostrado que esta estrategia favorece la neuroprotección y la remodelación funcional entre diferentes representaciones corticales, siendo este último mecanismo, sustrato para la neuro-restauración y la recuperación funcional post-ictus.

ABSTRACT:

Stroke is a leading cause of adult disability (including paralysis) and cognitive impairment and the second-leading global cause of death behind ischemic heart disease. It is estimated that 25-53% of patients remain dependent for at least one daily task up to 6 months after stroke, globally producing incalculable personal, family and social costs. Currently there are not therapies available to repair the damaged brain tissue and promote a satisfactory degree of functional recovery in patients. In recent decades, a considerable progress has been made in the development of experimental therapies to treat brain disorders. Among the different experimental approaches examined in the last decades, cell therapy has been configured as a viable option for restoring damaged brain areas with new cerebral tissue derived from exogenous implanted cells as well as for stimulating endogenous brain repair mechanisms. The relevance of this approach has been seen in later years, with a progressive expansion of clinical trials that have included patients with cerebral damage transplanted with different cell populations through systemic or intracerebral routes. The combined implantation of cells and different biomaterials to increase the viability of cellular grafts constitutes a very promising strategy in phase of full expansion. Due to its special chemical and physical structure with stiffness modules in the range of soft tissues like the brain, hydrogels appear a versatile and interesting group of architectonic elements for cell encapsulation and brain reconstruction. In this study, we show a novel therapeutic approach based on the combined implantation of mesenchymal stem cells and silk fibroin-based hydrogels as a support for brain stroke treatment. Firstly, we have demonstrated the innocuousness and tolerability of this biomaterial with brain tissue and function as well as its ability to favor cellular engraftment after brain implantation. Secondly, in an experimental stroke model in mice we have shown that this strategy favors neuroprotection and functional remodeling between cortical representations, being this latter, substrate for post-stroke neuro-restoration and functional recovery.

5-LOX	5-lipo-oxigenasa
7-ADD	7-aminoactinomicina D
ACV	Accidente cerebrovascular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIT	Accidente isquémico transitorio
AKBA	Ácido Acetil-11-ceto-\beta-boswellico
ANOVA	Análisis de la varianza
AP	Antero-posterior
APC	Alofococianina
APP	Proteína humana precursora del amiloide
ARN	Ácido ribonucleico
ARRIVE	<i>"Arrive Research: Reporting in Vivo Experiments"</i>
ATP	Adenosín trifosfato
ATR-FTIR	Espectroscopia de infrarrojos con reflectancia total atenuada mediante la transformada de Fourier
AWG	"American wire gauge"
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
bFGF	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
bFGF	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
BHE	Barrera hematoencefálica
BM	Barrido mucociliar
BMMNCs	Células mononucleadas de médula ósea
BMP	Proteína morfogénica ósea
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
Ca ⁺²	Calcio
CaAM	Calceína-AM
CC	Cuerpo calloso
CC	Cuerpo calloso
CCAO	Oclusión de la arteria carótida común
Células NK	Células "natural killer"
CF	5-(6)-carboxifluoresceína
CFU	Unidades formadores de colonias
CFU-Ad	Unidades formadores de colonias de adipocitos
CFU-Cd	Unidades formadores de colonias de condrocitos
CFU-F	Unidades formadores de colonias de fibroblastos
CFU-Ob	Unidades formadores de colonias de osteoblastos
CGE	Eminencias ganglionares caudales
ChR2	Canalrodopsina 2
CO ₂	Dióxido de carbono
Col I	Colágeno tipo I
Col IV	Colágeno tipo IV
col.	Colaboradores
COX-2	ciclo-oxigenasa
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
CX	Cortex cerebral
DBA	Dextrano amino biotinilado
DCX	Doblecortina
DIL	Octadecil indocarbocianina
dMCAO	Oclusión de la arteria cerebral media a nivel proximal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DV	Dorso-ventral

LISTADO DE ABREVIATURAS

ECA	Arteria carótida externa
ECM	Matriz extracelular
ECSs	Células madre embrionarias
ECV	Enfermedad cerebrovascular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEG	Electroencefalograma
EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EMG	Electromiograma
FBS	Suero bovino fetal
fMRI	Resonancia magnética funcional
FSC	Flujo sanguíneo cerebral
FSC	Tamaño celular "Forward Scatter"
GAP43	Proteína de membrana axonal 43
GDNF	Factor neurotrófico derivado de glia
GER	Glicina-glutámico-arginina
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GFP/EGFP	Proteína fluorescente verde
Gly-Ala	Glicina-alanina
GOS	Escala pronóstica de Glasgow
HA	Ácido hialurónico
HCL	Ácido clorhídrico
HE	Hematoxilina/eosina
HFIP	Hexafluoro-2-propanol
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HO-1	Hemo-oxigenasa 1
hPDGF-BB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas humano BB
HUVEC	Células endoteliales de venas umbilicales humanas
IB	Índice de barthel
Iba1	Molécula adaptadora de unión a calcio inoizado tipo 1
ICA	Arteria carótida interna
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico 1
IKVAV	Isoleucina-lisina-valina-alanina-valina
IL	Interleuquinas
IMDM	"Iscove's Modified Dulbecco's Medium"
INF- γ	Interferón gamma
IP	Ioduro de propidio
iPCSs	Células madre pluripotentes inducidas
IR-ATR	Espectroscopia de infrarrojos con reflectancia total atenuada
IR-ATR	Infrarrojo
L	Lateral
LGE	Eminencias ganglionares laterales
LPF	Potenciales locales de campo
LPS	Lipopolisacárido
M1	Corteza motora primaria
m ₁ CFL	Corteza motora primaria del campo representativo de las patas delanteras en su posición caudal
m ₁ RFL	Corteza motora primaria del campo representativo de las patas delanteras en su posición rostral
MAP2	Proteína asociada a microtúbulos 2
MBP	Proteína básica de mielina
MCA	Arteria cerebral media

MCAO	Oclusión de la arteria cerebral media
MEB	Microscopía electrónica de barrido por congelación
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MGE	Eminencias ganglionares mediales
mRS	Escala modificada de rankin
MSC/P	Células madre y progenitores de origen mesenquimal
MSCs	Células madre de origen mesenquimal
Na ₂ CO ₃	Carbonato sódico
NeuN	Proteína nuclear neural
NF-kB	Factor nuclear kapa-beta
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NIHSS	Escala de valoración del instituto nacional de salud en el ictus "National institute health stroke scale"
NPCs	Células madre y progenitores neurales
NREM	Sueño sin movimientos oculares rápidos
Nrf2	Factor nuclear eritroide-2 relacionado con el factor 2
NSCs	Células madre neurales
NSM	Neuronas espinosas medianas
NSSs	Escala de valoración neurológica modificada
NT-3	Neurotrofina 3
O ₂	Oxígeno
OGD	Privación de oxígeno y glucosa
OMS	Organización mundial de la salud
P/E	Penicilina/estreptomicina
p/v	Peso/volumen
PAA	Ácido poliacrílico
PBS	Tampón fosfato salino
PCA	Arteria cerebral posterior
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEs	Potenciales evocados
PESS	Potenciales evocados sensorimotores
PFA	Paraformaldehído
PGA	Ácido poliglicólico
PGF	Factor de crecimiento placentario
pGMA	2-poliglicerolmetacrilato
pHEMA	2-polihidroximetilmetacrilato
PHSRN	Prolina-histidina-serina-arginina-asparagina
PIGF	Factor de crecimiento placentario
PLA	Ácido poli-láctico
PLGA	Ácido poli láctico-co-glicólico
pMCAO	Oclusión de la arteria cerebral media a nivel distal
PS1	Presenilina 1
PVA	Alcohol poli-vinílico
r.f.c.	Fuerza centrífuga relativa
r.p.m	Revoluciones por minuto
REM	Sueño de movimientos oculares rápidos
RGD	Arginina-glicina,aspártico
RGDS	Arginina-glicina,aspártico-serina
RGV	Arginina-glicina-valina
RGY	Arginina-glicina-tirosina
RM-DWI	Resonancia magnética por imagen de difusión
rmEGF	Factor de crecimiento epidérmico recombinante murino

LISTADO DE ABREVIATURAS

RMI	Resonancia magnética por imagen
RMN	Resonancia magnética nuclear
RM-PWI	Resonancia magnética nuclear por imagen de perfusión
S1	Corteza somatosensorial primaria
S ₁ FL	Corteza somatosensorial primaria del campo representativo de las patas delanteras
S ₁ HL	Corteza somatosensorial primaria del campo representativo de las patas traseras
S2	Corteza somatosensorial secundaria
SCF	Factor de la célula madre
SDF-1	Factor derivado de célula estromal 1
SF	Fibroína de la seda
SF-MSC	Células madre y progenitores mesenquimales encapsuladas en hidrogeles de fibroína
SGZ	Región subgranular del giro dentado del hipocampo
SNC	Sistema nervioso central
SSC	Complejidad celular "Side Scatter"
SVZ	Zona subventricular
SWS	Sueño de ondas lentas
TAC	Tomografía axial computerizada
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta 1
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alpha
tPA	Activador tisular del plasminógeno
TTC	Cloruro 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolio
TTX	Tetrodoxina
UV/Visible	Ultravioleta/visible
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VGE	Eminencias ganglionares ventrales
VSD	Colorante sensible a voltaje
WT	Nativos silvestres
XTT	Sal disódica 2,3-Bis- (2-Metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -2H-tetrazolio-5-carboxanilida,

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Enfermedades cerebrovasculares.	3
1.2. Ictus: prevención, diagnóstico y tratamiento.	6
1.3. Terapia celular en ictus. Estudios preclínicos y clínicos.	9
1.4. Terapia celular asistida. Beneficios de la utilización de biomateriales en intervención neurorestaurativa.	25
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	35
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	41
3.1. Estudios “ <i>in vitro</i> ”.	43
3.1.1. Extracción de fibroína de la seda y obtención de los distintos formatos.	43
3.1.1.1. Obtención de “ <i>films</i> ” de fibroína.	44
3.1.1.2. Obtención de hidrogeles de fibroína.	44
3.1.2. Estudio y caracterización de hidrogeles de fibroína.	45
3.1.2.1. Monitorización del proceso de gelificación.	45
3.1.2.2. Caracterización microestructural de los hidrogeles de fibroína.	45
3.1.2.3. Caracterización mecánica de los hidrogeles de fibroína.	45
3.1.3. Expansión clonal de MSC/P.	46
3.1.4. Separación magnética negativa de MSC/P.	47
3.1.5. Caracterización inmunofenotípica de MSC/P.	48
3.1.6. Caracterización de MSC/P procedentes de ratones C57BL/6J-Tg(CAG-EGFP).	48
3.1.7. Capacidad multipotente y diferenciación de MSC/P.	49
3.1.8. Estudios “ <i>in vitro</i> ” de interacción entre MSC/P y fibroína.	50
3.1.8.1. Viabilidad, proliferación y ciclo celular de MSC/P en contacto con “ <i>films</i> ” de fibroína.	50
3.1.8.2. Curso temporal e intensidad de adherencia de las MSC/P sobre “ <i>films</i> ” de fibroína.	51

3.1.8.3. Estudios de viabilidad y proliferación de MSC/P integradas en hidrogeles de fibroína.	52
3.2. Estudios “ <i>in vivo</i> ”.	54
3.2.1. Animales.	54
3.2.2. Procedimientos quirúrgicos.	54
3.2.2.1. Trasplante intraestriatal de MSC/P y soluciones de fibroína.	54
3.2.2.2. Modelo animal de infarto cerebral.	55
3.2.2.3. Cirugías para implante de electrodos de registro. Procedimientos electrofisiológicos.	56
3.2.2.3.1. Registro del electroencefalograma (EEG) y el electromiograma (EMG) en animales sin restricción de movimiento.	56
3.2.2.3.2. Registro y análisis de potenciales evocados.	57
3.2.3. Estudios conductuales en los animales.	58
3.2.3.1. Test de la rejilla.	58
3.2.3.2. Test del cilindro.	59
3.2.3.3. Test del laberinto en Y.	59
3.2.4. Evaluación histológica de los cerebros e identificación de poblaciones celulares por citometría de flujo.	60
3.2.4.1. Identificación de depósitos de fibroína en el tejido cerebral.	60
3.2.4.2. Análisis de la respuesta inflamatoria en el tejido cerebral en respuesta al implante de fibroína.	60
3.2.4.3. Estudios de toxicidad celular en respuesta al implante de fibroína.	62
3.2.4.4. Estudios estereológicos para la identificación de MSC/P EGFP positivas en el tejido cerebral.	64
3.2.4.5. Evaluación histológica del infarto cerebral.	64
3.2.4.6. Cuantificación del edema cerebral y del territorio cortical perdido.	65
3.3. Análisis estadístico.	65

4. RESULTADOS.	67
4.1. Desarrollo y caracterización de un formato de fibroína de la seda adecuado para implante intracerebral	69
4.1.1. Desarrollo de un sistema inyectable basado en hidrogeles de fibroína de la seda.	70
4.1.2. Implante <i>in vivo</i> de hidrogeles de fibroína: modificaciones a nivel celular y tisular.	74
4.1.3. Implante <i>in vivo</i> de hidrogeles de fibroína: evaluación neurofisiológica de los animales.	80
4.2. Evaluación de la compatibilidad biológica entre la fibroína de la seda y las células madre y progenitores de origen mesenquimal. Estudios de integración celular con el biomaterial.	90
4.2.1. Enriquecimiento, expansión y caracterización de cultivos primarios de MSC/P procedentes de médula ósea.	91
4.2.2. Estudios de interacción <i>in vitro</i> entre las MSC/P y la fibroína de la seda.	95
4.2.2.1. Estudios sobre “ <i>films</i> ” de fibroína.	95
4.2.2.2. Estudios <i>in vitro</i> de integración de MSC/P en hidrogeles de fibroína.	104
4.2.3. Análisis <i>in vivo</i> de la supervivencia y retención de las MSC/P integradas en hidrogeles de fibroína.	106
4.3. Desarrollo y caracterización funcional de un modelo de daño cerebral en el ratón.	111
4.3.1. Evaluación de la extensión del daño producido y regiones corticales afectadas.	111
4.3.2. Caracterización de la función sensorimotora mediante tests de comportamiento y potenciales provocados en ratones infartados.	113
4.3.3. Análisis comparativo del modelo de infarto cortical en ratones de las cepas C57BL/6J y CD-1.	121
4.3.3.1. Extensión y distribución del infarto en ratones C57BL/6J y CD-1	121
4.3.3.2. Estudio de actividad evocada en corteza somatosensorial y motora en ratones C57BL/6J y CD-1.	123
4.4. Evaluación de la eficacia terapéutica del implante de células madre mesenquimales integradas en geles de fibroína.	133
4.4.1. La mejoría funcional post-infarto fue exclusiva de los animales implantados con MSC/P integradas en geles de fibroína.	136

4.4.2. La recuperación de la función sensorimotora en los animales implantados con MSC/P integradas en fibroína se relacionó con fenómenos de remodelación cerebral en áreas peri-infartadas.	141
4.4.3. La acción terapéutica de las MSC/P integradas en los hidrogeles de fibroína se relacionó con un efecto neuroprotector y posiblemente anti-inflamatorio.	145
5. DISCUSIÓN.	147
5.1. Hidrogeles de fibroína de la seda en intervención neurorrestaurativa.	149
5.1.1. Compatibilidad y tolerabilidad del biomaterial integrado en el tejido cerebral.	149
5.1.2. Estudios de compatibilidad entre MSC/P e hidrogeles de fibroína de la seda.	157
5.2. Desarrollo de un modelo de infarto cerebral en el ratón.	163
5.3. Remodelación cerebral y recuperación funcional post-ictus asistida con el tratamiento de MSC/P integradas en fibroína.	177
6. CONCLUSIONES.	187
7. BIBLIOGRAFÍA.	191
8. ANEXO.	229

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades cerebrovasculares.

Las enfermedades cerebrovasculares (ECV) engloban un conjunto de síndromes de diferente etiología y severidad que conducen a trastornos de la función cerebral de forma transitoria o permanente. Patológicamente, las ECV pueden ser consecuencia de: (i) alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral (FSC); (ii) trastornos en la circulación sanguínea corporal que modifiquen el flujo y presión sanguíneos; (iii) desordenes de la función cardíaca. El ictus, término procedente del latín cuyo significado es de “golpe”, representa un episodio súbito en la ECV (accidente cerebrovascular; ACV). El ictus puede producirse en la mayoría de los casos por un proceso obstructivo vascular (ictus isquémico), o por la rotura de uno o más vasos sanguíneos (hemorragia) y la extravasación de sangre (derrame) al espacio extravascular del propio tejido cerebral o fuera de él, conduciendo en ambos casos (isquemia y hemorragia) a una reducción o abolición total del aporte sanguíneo al cerebro.

Desde el punto de vista epidemiológico, los accidentes cerebrovasculares constituyen la segunda causa de defunción en el mundo y la primera en causar discapacidad grave en adultos (OMS; Organización mundial de la salud; actualizado enero 2017) ([Hankey 2017](#)).. Su incidencia ha aumentado hasta en un 20% en los últimos años ([Krishnamurthi et al 2013](#)), incrementándose la susceptibilidad a padecer esta afección vascular en edades cada vez más tempranas ([Graziano et al 2016](#), [Marini et al 2010](#), [Smajlovic 2015](#)). En España, los ACV constituyen el motivo más frecuente de hospitalización, siendo la segunda causa de muerte en la población general y la primera en mujeres ([Gonzalez-Henares et al 2016](#)). Además, la probabilidad de padecer un ACV se incrementa con la edad ([Catala-Lopez et al 2015](#)). A nivel mundial, en el 30 % de los casos, los ACV producen la muerte del individuo ([Hankey 2017](#)), y entre los afectados que sobreviven, un 20% presentan secuelas discapacitantes de diverso índole; problemas en la movilidad (85%), dificultades en la comunicación (39%) y problemas de aprendizaje (34%) ([Noe-Sebastian et al 2017](#)). Se estima que una proporción sustancial de los pacientes (25-53%) siguen siendo dependientes para la realización de al menos una tarea cotidiana hasta 6 meses después del ACV ([Carmichael 2016](#)), siendo incalculable el coste personal, familiar y social que genera esta patología ([Martinez-Vila & Irimia 2004](#)). Desde el punto de vista económico, un 3% del gasto sanitario de nuestro país se invierte en la prevención, diagnóstico y tratamiento del ACV ([Brea et al 2013](#)).

Los ictus más frecuentes (>85 %) son de tipo isquémico (**Figura 1.1.;**[Diez-Tejedor et al 2001](#)), cuya etiología más común es el estrechamiento gradual (ateroesclerosis) y oclusión súbita (trombosis o embolismo) de alguna de las grandes arterias cerebrales, así como procesos obstructivos en vasos de pequeño calibre (infartos lacunares o de origen incierto) ([Mozaffarian et al 2016](#)). En función del territorio cerebral afectado, se pueden originar isquemias cerebrales focales, donde la reducción del FSC se circunscribe al territorio irrigado por la arteria ocluida, o isquemias globales, características de la parada cardiorrespiratoria, *shock*, o fenómenos de

hipotensión arterial, afectando a la totalidad del encéfalo de forma difusa. El 15% restante de los ictus son de tipo hemorrágico (**Figura 1.1.**), ocasionados, tal y como se ha comentado anteriormente, por la extravasación de la sangre a consecuencia de la rotura de una arteria o vaso, que en función de la localización cerebral de la misma, se puede subdividir en hemorragias subaracnoideas (afectando a vasos sanguíneos en la superficie cerebral, extra-axial) o intracerebrales (rotura de vasos en el parénquima cerebral, intra-axial) ([Mozaffarian et al 2016](#)). Como luego se comentará, uno de los agentes etiológicos más importantes en la hemorragia cerebral es la hipertensión.

En el caso concreto de los ictus isquémicos focales, la duración de la oclusión permite discriminar entre un accidente isquémico transitorio (AIT) y un infarto cerebral. Como regla general se puede hablar de AIT cuando los síntomas que provoca el ictus son transitorios y se resuelven en menos de 24 horas. Sin embargo, la diferencia estriba no tanto en el tiempo de la isquemia como en que no se produzca un daño permanente (infarto cerebral). Cuando el episodio isquémico es prolongado en el tiempo y existe una pérdida celular irreversible, así como consecuencias neurológicas, podemos hablar de infarto cerebral ([Garcia 1984](#)). En el infarto cerebral se establece un área de lesión, consistente en un núcleo central, donde se produce una abolición completa del FSC y el tejido afectado evoluciona a tejido infartado. Además se origina un descenso de FSC no tan acusado en regiones periféricas donde las células que componen el tejido cerebral se encuentran estructuralmente intactas pero funcionalmente inactivas. Esta región perilesional recibe el nombre de penumbra isquémica ([Astrup et al 1977](#)). En 1977, Astrum y colaboradores confirmaron que cuando el deterioro en el FSC persistía en el tiempo, la penumbra isquémica evolucionaba a región infartada, o por el contrario si se reperfundía la zona incrementando el FSC, el tejido volvía a ser funcionalmente activo ([Astrup et al 1977](#)).

Figura 1.1. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular según su etiología y territorio afectado. Modificado de ([Diez-Tejedor et al 2001](#)).

Los estudios epidemiológicos han permitido identificar un gran número de factores de riesgo asociados al ictus que reflejan la heterogeneidad de esta patología. Tradicionalmente, los factores de riesgo vascular han sido clasificados en modificables, potencialmente modificables o no modificables ([Sacco 1997](#)). Éstos últimos, son inherentes al individuo (edad, raza, sexo, expresividad génica) y su detección resulta de vital importancia para favorecer la inclusión de aquellos sujetos con mayor riesgo de padecer afecciones vasculares, en programas de terapia preventiva y de monitorización. Entre los factores de riesgo no modificables, el envejecimiento es el que presenta mayor índice de prevalencia, y es independiente de si el trastorno vascular es de tipo isquémico o hemorrágico. A partir de los 55 años, el riesgo de padecer un ictus se duplica cada década, y los individuos varones presentan un 30% más de probabilidades de sufrir esta patología que las mujeres, aunque en ellas los ictus de tipo hemorrágico son más frecuentes ([Brown et al 1996](#)), y la mortalidad más elevada ([Appelros et al 2010](#), [Mirzaei 2017](#)). En cuanto a la etnia o raza, los afroamericanos y orientales presentan una mayor incidencia y mortalidad que los sujetos de raza caucásica ([Pastore et al 2017](#)). Un hecho universalmente aceptado es que la presentación de varios factores de riesgo relativamente modificables (colesterol, hipertensión, diabetes, tabaco, alcohol, obesidad, sedentarismo) incrementa exponencialmente la probabilidad de padecer una patología cerebrovascular ([Bentsen et al 2014](#), [Ois et al 2013](#), [Sacco et al 1997](#)). La hipertensión arterial es el factor de riesgo con mayor incidencia en el infarto cerebral ([García-Ortiz et al 1993](#), [Gonzalez-Gomez et al 2016](#), [Roca-Cusachs Coll et al 2008](#)). La diabetes mellitus también presenta una elevada prevalencia y se acompaña de otras patologías que pueden incrementar el riesgo de ACV como la hipertensión, la obesidad y la arterioesclerosis ([Kitagawa 2016](#), [Shinozaki et al 2016](#)). El consumo de alcohol y el tabaquismo elevan también el riesgo de padecer un ictus ([Gorelick et al 1999](#)), hasta el doble en el caso del tabaco, y al cesar el hábito pasados 2-4 años se consigue reducir dicho riesgo ([Lind et al 2004](#)). Un estudio reciente relaciona los distintos factores de riesgo con el tipo de ictus y su prevalencia en la sociedad española (**Tabla 1.1.**).

Tabla 1.1. Prevalencia de los factores de riesgo vascular en los accidentes cerebrovasculares. *Modificada de ([Arias-Rivas et al 2012](#)).*

	Ictus isquémico	Ictus hemorrágico
Edad	71,3	72,2
AIT previo	10%	3%
Ictus previo	16%	16%
Hipertensión	67%	69%
Diabetes	30%	25%
Tabaquismo	23%	16%
Consumo alcohol	11%	10%
Fibrilación auricular	19%	17%
Sedentarismo	18%	15%
Obesidad	13%	13%

1.2. Ictus: prevención, diagnóstico y tratamiento.

Debido a la heterogeneidad del ACV, en cuanto a los factores de riesgo y a la etiología de la enfermedad, existen diversos tipos de tratamientos y actuaciones preventivas, primarias o secundarias ([Meschia et al 2014](#)). La identificación de factores de riesgo en el ictus ha permitido establecer medidas de control preventivas, tanto en los individuos que ya han padecido una afección cerebrovascular (prevención secundaria), como en aquellos que todavía no la han sufrido (prevención primaria). Las medidas preventivas incluyen, el cambio en los hábitos de vida (tabaquismo, consumo de alcohol, ejercicio diario) así como el control de la presión arterial, los niveles de colesterol, glucemia o el peso. Por otro lado, el riesgo de sufrir un ictus isquémico es especialmente elevado tras un AIT. Aproximadamente un 5 % de los pacientes experimentan un ictus durante los dos primeros días tras un AIT, el 8% durante el primer mes y hasta el 9,2% durante los primeros 90 días ([Wu et al 2007](#)). Dado que los AITs suelen ser el preludio de un infarto cerebral que sucede durante el siguiente año, su identificación permite reducir el riesgo de ictus recurrentes ([Arias-Rivas et al 2012](#)).

El inicio del tratamiento rápido del ictus depende estrechamente del reconocimiento de signos y síntomas en el área de urgencias hospitalaria ([Brott & Bogousslavsky 2000](#), [Hankey 2017](#)). La presencia de hemiparesis, la pérdida de sensibilidad, la alteración del habla, el vértigo y la alteración de la marcha son característicos de un ACV. Las diferentes escalas de valoración neurológica permiten evaluar las manifestaciones del ACV ([Kasner 2006](#)) y examinar los posibles déficits sensorimotrices y cognitivos del enfermo, además de constituir herramientas muy valiosas para la inclusión/exclusión de pacientes en distintos ensayos clínicos (**Tabla 1.2.**).

Tabla 1.2. Escalas neurológicas comúnmente utilizadas para la valoración clínica del ACV.

National Institute Health Stroke Scale (NIHSS). (Brott et al 1989)	Examina el nivel de conciencia, visión, paresia, fuerza, sensibilidad, coordinación y/o lenguaje. Valora de 0-3 puntos los 15 ítems examinados, y puntuaciones superiores a 17 indican un mal pronóstico (Frankel et al 2000).
Escala Modificada de Rankin (mRS). (Burn 1992)	Examina el grado de discapacidad y estado de ánimo del paciente. Valora en 6 estados a los pacientes, siendo el último la muerte.
Índice de Barthel (IB) (Granger et al 1989)	Examina la autonomía de los pacientes para realizar actividades diarias (la marcha, lavarse, subir y bajar escaleras, etc). Valora con una puntuación de 0 a 100 a los pacientes, y una valoración inferior a 60 indica dependencia.
Escala pronóstica de Glasgow (GOS) (McMillan et al 2016)	Examina la recuperación de los pacientes tras el ACV. Valora en 5 estados a los pacientes.

El uso de técnicas diagnósticas por imagen permite excluir hemorragias craneales y otras posibles patologías que pudieran ser responsables del cuadro clínico, además de poder evaluar el grado y extensión de la lesión vascular. Entre las técnicas disponibles actualmente, la tomografía axial computerizada (TAC) es la más sostenible y disponible en hospitales, permitiendo el diagnóstico diferencial entre un ictus hemorrágico, isquémico o cualquier otra causa responsable de los signos clínicos ([Wityk & Beauchamp 2000](#)). Otra técnica muy utilizada es la angiografía TAC, que permite detectar de forma rápida la oclusión de grandes vasos con una alta sensibilidad. La resonancia magnética por imagen (RMI), es la prueba más sensible para detectar la isquemia cerebral. La incorporación de la RM de difusión (DWI) y perfusión (PWI), permite, además de valorar precozmente el ictus isquémico, realizar una evaluación funcional del paciente y correlacionar el volumen inicial de la lesión con el grado de déficit neurológico medido con las escalas convencionales de valoración clínica ([Lovblad et al 1997](#), [Tong et al 1998](#)). Alteraciones en la RM-PWI son consistentes con la existencia de tejido hipoperfundido o en riesgo de dañarse, a diferencia de la RM de difusión, que denota la presencia de tejido irreversiblemente lesionado ([Schellinger et al 2001](#)). Es por ello, que el desacoplamiento entre ambas imágenes o “*mismatch PWI-DWI*” se emplea como un método predictivo de la expansión del tejido infartado, relacionándose con un peor pronóstico del ACV ([Arenillas et al 2002](#)).

En el ictus isquémico, el restablecimiento temprano del flujo sanguíneo en el vaso obstruido resulta determinante en la evolución clínica del paciente. La inyección intravenosa del activador tisular del plasminógeno (tPA) sola o en combinación con procedimientos quirúrgicos como la trombectomía endovascular constituyen actualmente el abordaje terapéutico más eficaz para la eliminación del proceso obstructivo ([Brott & Bogousslavsky 2000](#), [Campbell & Mitchell 2015](#), [Emberson et al 2014](#), [Goyal et al 2016](#), [Hankey 2017](#), [Saver et al 2015](#)). Sin embargo, su eficacia clínica es limitada, ya que la ventana terapéutica para el tratamiento trombolítico (tPA) o la intervención quirúrgica se encuentra restringida a las primeras 2-4 horas tras el accidente isquémico o ictus. En relación a la cirugía endovascular, muchos centros hospitalarios no cuentan con especialistas en este tipo de intervenciones, ocasionando, de uno u otro modo, que únicamente el 5% de los pacientes se vean beneficiados por este tipo de terapias ([Emberson et al 2014](#), [Goyal et al 2016](#)). Otras medidas adicionales en el tratamiento del ictus isquémico incluyen el control hemodinámico del paciente, su temperatura, presión intracraneal, hiperventilación y/o craniectomía descompresiva para reducir la presión intracraneal o la regulación de los niveles de glucemia. Por ejemplo, está ampliamente aceptado que la hiperglucemia en este tipo de pacientes puede incrementar el riesgo de edema cerebral ([Savopoulos et al 2017](#)).

En el caso de los ACV de tipo hemorrágico, las actuaciones terapéuticas se centran en prevenir la expansión del edema y/o hemorragia. La hiperventilación, la reducción de la presión sanguínea por debajo de 160mmHg en las primeras horas desde el ACV, ([Kuramatsu et al 2015](#)), así como la realización de craneotomías y drenajes a través de catéteres que disminuyan la presión

intracraneal y mitiguen el edema cerebral ([Myint et al 2016](#), [Salmela et al 2017](#), [Ziai et al 2014](#)) se asocian con un mejor pronóstico.

Los pacientes que sobreviven a un ACV y no reciben el tratamiento adecuado dentro de esta estrecha ventana terapéutica, o bien recibiendo éste no resulta efectivo, a menudo presentan secuelas discapacitantes ([Emberson et al 2014](#)). Para estos pacientes, no hay actualmente disponibles terapias capaces de reparar el tejido cerebral dañado y promover un grado satisfactorio de recuperación funcional ([George & Steinberg 2015](#)). Algunas estrategias terapéuticas como la rehabilitación física y cognitiva, técnicas de estimulación magnética transcranial o estimulación eléctrica directa pueden conducir a una mejoría funcional en algunos pacientes durante la fase crónica de la enfermedad. Sin embargo, el conjunto de evidencias actuales es aún insuficiente para trasladar este tipo de procedimientos a la práctica médica ([Krucoff et al 2016](#)). Existen resultados contradictorios entre distintos grupos sobre la eficacia de este tipo de abordajes, probablemente relacionados con la heterogeneidad y bajo número de pacientes participantes en los ensayos clínicos ([Corbetta et al 2015](#), [Levy et al 2008](#), [Levy et al 2016](#)), así como falta de consenso en las metodologías utilizadas ([Laver et al 2015](#)).

No obstante, el uso de estrategias neurorrehabilitadoras sigue siendo muy prometedor para el restablecimiento y mejoría funcional de los pacientes con ictus ([Murie-Fernandez et al 2010](#)). En 1996 se obtuvo una de las primeras evidencias de cómo la terapia rehabilitadora con entrenamiento físico conduce a fenómenos de reorganización cerebral que son responsables de la recuperación funcional en monos con ictus ([Nudo et al 1996b](#)). Nudo y col., demostraron que tras la rehabilitación, la función del campo motor dañado correspondiente a la extremidad afectada, era asumida por regiones intactas dentro del hemisferio afectado (ipsilateral), adyacentes a la zona del daño cerebral (peri-lesional). Esta reorganización o plasticidad cerebral (reorganización de representaciones sensoriales y motoras) ha sido descrita en otros modelos preclínicos y en pacientes durante la fase de recuperación espontánea o inducida por rehabilitación ([Alia et al 2017](#), [Brown et al 2009](#), [Brown et al 2007](#), [Dijkhuizen et al 2001](#), [Harrison et al 2013](#), [Jaillard et al 2005](#), [Liepert et al 2001](#)). Un aspecto importante hace referencia al mejor punto temporal para iniciar la neurorehabilitación tras el ACV, así como el tipo concreto de entrenamiento. Varios estudios sugieren que el inicio de la movilización de los pacientes desde las primeras 24 horas tras el ACV favorece la recuperación funcional en comparación con aquellos pacientes en los que la movilización es más tardía ([Bernhardt et al 2008](#), [Salter et al 2006](#)). De forma similar, se ha estudiado el tiempo óptimo de aplicación de la terapia neurorrehabilitadora en ratas con ictus focales, determinando que el inicio temprano de la misma (2 semanas después de la cirugía isquémica) proporciona una mayor plasticidad en regiones contra-lesionales, favoreciendo la recuperación funcional de los animales a través de la formación de nuevas proyecciones en el cortex intacto y la región subcortical del hemisferio dañado ([Biernaskie et al 2004](#)). Por otro lado, en infartos unilaterales que afectan a la coordinación motora, puede producirse una mayor pérdida de territorio cortical funcional, no sólo por el propio daño isquémico, sino también por el desuso de

la extremidad afectada (contralateral a la región dañada), conduciendo a un menor grado de recuperación, tal y como se ha observado en estudios preclínicos y clínicos ([Dromerick et al 2006](#), [Kerr et al 2013](#), [Nudo et al 1996a](#)). Esta pérdida progresiva de la representación cortical puede ser prevenida por el uso de terapias basadas en la restricción del movimiento del miembro sano, estimulando así el uso de la extremidad parética ([Liepert et al 1998](#), [Liepert et al 2001](#), [Morris & Taub 2001](#)), o por el contrario, puede verse incrementada por fenómenos compensatorios basados en el entrenamiento de la extremidad no parética (contralateral al hemisferio intacto) induciendo cambios maladaptativos que incrementan los déficits motores y el desuso del miembro parético ([Allred & Jones 2008](#), [Allred et al 2005](#)). Las evidencias actuales sostienen que hay una ventana óptima para el tratamiento post-daño cerebral y la neuroplasticidad, donde es posible conseguir la mayor eficacia terapéutica por ejemplo tras la rehabilitación física ([Murphy & Corbett 2009](#)). Aunque esta corriente ideológica aún es objeto de debate, ya que muchos pacientes con ictus continúan mejorando durante años, sugiriendo que esta ventana temporal es posible que nunca se llegue realmente a cerrar.

Por otro lado, estudios realizados en animales han demostrado que la estimulación eléctrica cerebral como complemento a la terapia física puede incrementar la recuperación funcional de ratas ([Guggenmos et al 2013](#), [Kleim et al 2003](#)) y aumentar la plasticidad neuronal en primates ([Plautz et al 2003](#)). Una de las primeras evidencias de que la estimulación intracortical induce cambios plásticos, vino de la mano de los estudios de Nudo y col., realizados en ratas ([Nudo et al 1990](#)). Observaron como la estimulación intracortical repetida en periodos de 1 a 3 horas, sobre el cortex motor implicado en la modulación del movimiento de la extremidad anterior, produjo un incremento de la región cerebral encargada de evocar el movimiento tras la estimulación (área somatotípica), desplazándose hacia áreas corticales cercanas. Determinaron, que los cambios plásticos observados fueron transitorios, y que podrían explicarse por la inhibición cortical derivada de la estimulación repetida del área motora ([Nudo et al 1990](#)). En el escenario clínico, varios estudios avalan el uso de la estimulación eléctrica directa para favorecer la recuperación funcional ([Levy et al 2008](#)), sin embargo estudios recientes han mostrado resultados negativos al respecto ([Levy et al 2016](#)). La estimulación magnética transcraneal ha sido empleada para definir las áreas somatotípicas dañadas tras el ictus ([Lorca-Puls et al 2017](#)), sin embargo no hay datos suficientes que avalen su uso regular en la clínica ([Gharabaghi et al 2014](#), [Peres et al 2017](#)).

1.3. Terapia celular en ictus. Estudios preclínicos y clínicos.

El uso de técnicas de terapia celular para el tratamiento de enfermedades humanas se remonta históricamente a la década de los 50 del siglo pasado, específicamente al campo de las hemopatías. En esos años, dos grupos independientes observaron cómo la administración intravenosa de células de médula ósea, favorecía la regeneración hematopoyética de ratones sometidos previamente a mieloblación total por irradiación ([Jacobson et al 1951](#), [Lorenz et al 1951](#),

[Main & Prehn 1955](#)). En base a estos hallazgos, Donnal Thomas y col. fueron los pioneros en realizar el primer trasplante de médula ósea en pacientes, obteniendo la suspensión celular a injertar, a partir del aspirado de costillas de cadáveres o de la cresta iliaca de donantes, con el mismo fenotipo sanguíneo que el paciente ([Thomas et al 1957](#)). En uno de los seis casos presentados en este artículo, Thomas y col., describen como la inyección en días sucesivos (3 días) tras la radiación total del paciente con leucemia avanzada, consiguió restablecer la función hematopoyética en el mismo, detectándose eritrocitos del donante en el torrente sanguíneo del paciente. Sin embargo, esta restauración parcial fue insuficiente para la recuperación total de la hematopoyesis, puesto que en días posteriores se volvieron a detectar bajos niveles de eritrocitos circulantes. Años después Tomas y col., publicaron un segundo estudio donde 100 pacientes con leucemia aguda recibieron el trasplante alogénico de parientes, presentándose una remisión en el ~ 20% de los mismos ([Thomas et al 1977](#)), lo que le valió el premio Nobel en 1990.

Desde entonces, la terapia celular se ha configurado como una estrategia plausible para la regeneración de tejidos y órganos. Un ejemplo de ello, es la aprobación para el uso clínico de células madre límbicas en el tratamiento de quemaduras oculares en la Unión europea ([Rama et al 2010](#)), o células madre de origen mesenquimal (MSCs) para atenuar la reacción del injerto contra huésped, principal causa del fallo hematopoyético tras el trasplante, en Canada y Nueva Zelanda ([Ratcliffe et al 2013](#)), o el tratamiento de fisuras perianales en enfermos de Chron, aprobado recientemente en Europa ([Panes et al 2016](#)).

El número de estudios clínicos ha ido creciendo exponencialmente. Por ejemplo, en el caso concreto de las MSCs, más de 300 ensayos clínicos se han realizado en los últimos años para estudiar el potencial reparador de esta población celular en afecciones de hueso, cartílago, corazón, pulmón, hígado, riñón, enfermedades autoinmunes y gastrointestinales, así como desórdenes neurológicos ([Trounson & McDonald 2015](#)). La terapia celular representa por tanto un abordaje muy prometedor para favorecer la regeneración de diversos tejidos incluyendo el tejido cerebral, configurándose como una alternativa realista a la recuperación total o parcial de la función o funciones pérdidas tras un ACV ([Bang et al 2016](#), [Lees et al 2012](#), [Mir & Savitz 2013](#)). Las células implantadas podrían actuar sobre aquellos mecanismos moleculares y celulares que de una u otra forma son mayoritariamente responsables de la recuperación funcional tras un daño cerebral (**Figura 1.2.**). Si bien múltiples evidencias han constatado el papel terapéutico de diferentes poblaciones de células madre y precursores celulares para estimular los dos primeros mecanismos, en concreto la neuroprotección (1) y el reemplazamiento de la circuitería dañada (2) ([Bao et al 2011](#), [Koh et al 2008](#), [Nakano-Doi et al 2010](#), [Ramos-Cabrer et al 2010](#), [Shinozuka et al 2013](#), [Shyu et al 2006](#), [Taguchi et al 2004](#), [Wang et al 2016b](#), [Yang et al 2010](#)), las evidencias de su contribución a potenciar los mecanismos de remodelación cerebral y reorganización somatotípica, anteriormente comentados ([Nudo et al 1996b](#)), son meramente testimoniales ([Andres et al 2011](#)). Genéricamente, las células madre, progenitores y precursores poseen propiedades para diferenciarse a fenotipos celulares progresivamente más maduros así como

capacidad para secretar distintos factores tróficos ([Gervois et al 2016](#), [Lees et al 2012](#)). Estas propiedades de diferenciación y secreción de factores pueden ser explotadas terapéuticamente para (1) proteger las neuronas de un entorno tan hostil como el hipóxico y disminuir la repuesta inflamatoria post-isquemia que comúnmente exacerba el daño cerebral ([Bernstock et al 2017](#), [Dirnagl et al 1999](#)); (2) favorecer el reemplazamiento celular y la circuitería cerebral dañada ([Ramos-Cabrer et al 2010](#), [Taguchi et al 2004](#), [Wang et al 2016b](#)); y (3) potenciar los mecanismos de plasticidad cerebral en regiones no dañadas del hemisferio intacto y afectado ([Andres et al 2011](#)).

Figura 1.2. Mecanismos para restaurar la funcionalidad adscrita a un daño cerebral; modificada de ([Burns et al 2009](#)). Tras un daño cerebral, las células neurales (neurona pre-isquémica) atraviesan diferentes estados degenerativos hasta la pérdida total de su función. En un primer momento, la falta de O_2 y nutrientes por la reducción del FSC, induce un estado inactivo de las células que puede ser revertido (neurona no funcional). Si la hipoxia es mantenida, se produce la muerte neuronal irreversible cuyo resultado final es la pérdida de conexiones neurales y la degeneración de las sinapsis. Se han propuesto varios mecanismos que subyacen a la restauración funcional: 1- Neuroprotección: permite el rescate de neuronas en la zona de penumbra isquémica, que se encuentra intactas, pero funcionalmente inactivas, preservando así los circuitos preexistentes y limitando la extensión del daño cerebral. 2-Neurorrestauración: es el mecanismo que actúa una vez se ha producido la muerte neuronal ("core" del infarto). Se forman nuevas poblaciones neurales (neurogénesis endógena) reemplazándose la circuitería dañada. Sin embargo el reemplazo celular eficiente depende de la preservación de la citoarquitectura y de la conectividad circundante. 3-Neuroplasticidad: es posible la formación de nueva circuitería y de nuevas sinapsis en el hemisferio no afectado y dañado, en regiones peri-lesionales o alejadas de la zona de daño que pueda suplir parcial o totalmente la función perdida.

Entre los diversos tipos de células madre, progenitores y precursores celulares, en un principio las células madre de tipo neural (NSCs) y los precursores neurales (NPCs), se establecieron como las poblaciones celulares ideales para estimular la reparación del sistema nervioso central. Durante el desarrollo embrionario, la neurogénesis se produce de forma muy activa principalmente en dos regiones cerebrales; la zona subventricular (SVZ) y las eminencias ganglionares (zonas germinales) ventrales y laterales (VGE y LGE), siendo la primera región (SVZ) la que origina la mayor población de neuronas del neocórtex, mientras que las zonas germinales dan lugar a las neuronas de los ganglios basales y a las interneuronas neocorticales ([Rallu et al 2002](#)). Las eminencias ganglionares medial (MGE) y caudal (CGE), guían la migración neuronal y axonal durante los primeros estadios del desarrollo y algunos meses después del nacimiento ([Paredes et al 2016](#)), siendo estructuras subcorticales transitorias que se empaquetan sobre el tálamo y el núcleo caudado, desapareciendo al año de edad ([Encha-Razavi & Sonigo 2003](#)). Las neuronas maduras, pierden su capacidad mitótica y migran guiadas a través de las MGE/CGE, mientras que aquellas que permanecen como neuronas indiferenciadas permanecen en la región SVZ como células madre y precursores neurales (NSCs y NPCs) ([Encha-Razavi & Sonigo 2003](#)). Por otro lado, en un cerebro adulto los principales nichos neurogénicos están restringidos a la región ventricular y subventricular (V-SVZ) de ambos ventrículos laterales y a la región subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo ([Kaneko et al 2017](#)). La neurogénesis adulta es regulada a lo largo de varias etapas, que incluyen el mantenimiento y autorrenovación de las NSCs, proliferación de los NPCs y su migración, supervivencia, maduración e integración celular en circuitos neuronales establecidos ([Kaneko et al 2017](#)). Tras un daño isquémico, se produce una migración de NPCs endógenas hacia las zonas de daño ([Arvidsson et al 2002](#), [Reumers et al 2008](#)), pero el número e integración de nuevas neuronas es insuficiente para el restablecimiento de las funciones neurológicas perdidas ([Arvidsson et al 2002](#)), por lo que aunque presentes, los mecanismos de neurogénesis endógena son extraordinariamente ineficientes ([Arvidsson et al 2002](#)).

Desde hace varios años, un campo prometedor se asienta en la búsqueda activa de estrategias terapéuticas, basadas en el implante de factores o células terapéuticas, que puedan estimular estos mecanismos. Son varias las rutas de señalización que contribuyen a estimular los mecanismos de neurogénesis endógena tras el daño isquémico. Por ejemplo, la señalización mediada por el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la proteína morfogénica ósea (BMP), el factor de crecimiento nervioso (NGF) o el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) ([Chou et al 2006](#), [Iosif et al 2008](#), [Leker et al 2009](#), [Sims et al 2009](#), [Sun et al 2003](#)) siendo el equilibrio entre los distintos factores de crecimiento, citoquinas y neurotransmisores particularmente complejo de resolver para lograr la neurogénesis más eficaz posible ([Miller & Gauthier 2007](#)).

El implante de NSCs se planteó como una posibilidad terapéutica para favorecer la producción e integración de estirpes neurales maduras (provenientes de las NSCs donantes) en la zona de daño y/o en regiones peri-lesionales ([Chu et al 2004](#), [Riess et al 2002](#), [Zhu et al 2011](#)). Además de incrementar la formación de nuevas sinapsis y la integración celular en circuitos pre-existent

([Englund et al 2002](#)), la administración temprana de NSCs puede favorecer la neuroprotección y reducir la respuesta inflamatoria ([Chu et al 2004](#)), estimular la propia neurogénesis endógena ([Hattiangady et al 2007](#), [Zhu et al 2011](#)) o los mecanismos de angiogénesis y formación de nuevos vasos ([Augustad et al 2017](#)), contribuyendo a la reparación tisular ([Englund et al 2002](#), [Wang et al 2016b](#)). Parte del efecto de las NSCs puede ser explicado por su actividad secretoma ([Augustad et al 2017](#), [Kamei et al 2007](#)), incluyendo la liberación de moléculas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o los anteriormente comentados BDNF, NGF o TNF- α , ([Harms et al 2010](#), [Nan et al 2005](#), [Roitbak et al 2008](#)). Por poner algunos ejemplos representativos de la eficacia de las NSCs en el tratamiento post-ictus, en el estudio de Andres y col., se demostró que el implante de NSCs humanas aumentaba el transporte axonal, las ramificaciones dendríticas y el crecimiento y la propagación axonal, todos ellos mecanismos que contribuyeron a incrementar la plasticidad neuronal promoviendo la recuperación funcional de ratas con isquemia focal ([Andres et al 2011](#)). En otro estudio más reciente, Wang y col., confirmaron que el co-trasplante intracerebral de NSCs humanas junto con un proteasa con actividad anticoagulante (3K3A-APC) para estimular la expansión celular de las NSCs implantadas *in vivo*, estimuló eficazmente la restauración de los circuitos neuronales, mediante la integración de células maduras procedentes de las NSCs trasplantadas, favoreciendo la recuperación funcional de los animales ([Wang et al 2016b](#)). Entre las desventajas más acusadas para el uso clínico de las NSCs destacan su escasa disponibilidad y dificultad de expansión *ex vivo* ([Gervois et al 2016](#), [McLaren 2001](#), [Nunes et al 2003](#)).

En una gran variedad de estudios se han utilizado células madre embrionarias (ESCs). Las ESCs son células pluripotentes con capacidad para autorrenovarse y diferenciarse hacia cualquier fenotipo celular del organismo, incluyendo el linaje neural ([Bain et al 1995](#), [Reubinoff et al 2001](#), [Zhang et al 2001](#)). En varios estudios preclínicos se ha demostrado la capacidad de las ESCs para promover la recuperación funcional post-ischemia ([Wei et al 2005](#), [Yanagisawa et al 2006](#)). Sin embargo, las limitaciones de tipo ético derivadas de su aislamiento a partir de tejido embrionario ([Thomson et al 1998](#)) así como la transformación maligna de este fenotipo celular y la tendencia a la aparición frecuente de teratomas *in vivo* ([Reubinoff et al 2000](#), [Solter 2006](#)), las hace menos viables para su aplicación clínica.

Una alternativa al uso de NSCs y ESCs es el uso de otras poblaciones celulares como son las células madre mesenquimales (MSCs), las células mononucleadas de médula ósea (BMMNCs) y las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). Estas estirpes celulares han mostrado efectos neuroprotectores y neuro-regenerativos en distintos modelos animales, permitiendo en algunos casos (BMMNCs y MSCs) el trasplante alogénico y autólogo entre pacientes ([Bang et al 2005](#), [Moniche et al 2012](#), [Steinberg et al 2016b](#), [Suarez-Monteagudo et al 2009](#), [Taguchi et al 2015](#)). Estas poblaciones celulares pueden ser aisladas y/o generadas con relativa facilidad, además de poder ser expandidas *ex vivo* sin dificultad, para su posterior trasplante. Entre los beneficios potenciales que aportan las MSCs, las iPSCs o las BMMNCs, se encuentran modular el microambiente tisular mediante la secreción de diversos factores de crecimiento, algunos de ellos

moduladores de la respuesta inmune, mientras que otros permiten la reducción de los procesos apoptóticos y de la cicatriz glial o la estimulación de los mecanismos de neurogénesis y angiogénesis endógenos ([Honmou et al 2012](#), [Janowski et al 2010](#), [Li & Chopp 2009](#)) (Figura 1.3.).

Figura 1.3. Mecanismos de acción de las terapias basadas en células madre en el contexto del daño cerebral (ictus) (Modificado [\(Gervois et al 2016\)](#)). Tras el accidente cerebrovascular, el microambiente cerebral puede ser modulado por distintos mecanismos de reparación tisular basados en la liberación de factores a través de células madre exógenas. La contribución de las células madre a la reparación se puede relacionar en parte con la estimulación de la proliferación, migración y diferenciación de NSCs endógenas hacia células del linaje neural. Por otro lado, las células madre pueden estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) favoreciendo la revascularización de la región perilesionada, así como la formación de sinapsis y conectividad anatómica y funcional con circuitos pre-existentes. También se pueden favorecer los mecanismos de neuroprotección en el tejido isquémico y en áreas de penumbra, reduciendo el estrés oxidativo que causa daño y fragmentación del ADN, disminuyendo así la apoptosis celular. La inmunomodulación ejercida por las células terapéuticas incluye la inhibición de la activación de linfocitos tipo B y T y células NK ("Natural killer") además de reducir la infiltración de neutrófilos y células dendríticas sanguíneas. Otro mecanismo de acción es la activación de la microglía M2 de tipo inmunosupresor ([Tang & Le 2016](#)). La mayor parte de los efectos descritos son mediados por la liberación paracrina de factores solubles o por interacciones célula-célula.

En el caso de las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), éstas conservan muchas de las propiedades funcionales encontradas en las ESCs, exhibiendo una morfología similar, expresión endógena de genes de pluripotencia y la capacidad para autorenovarse o diferenciarse a progenitores, precursores y células maduras de distinto origen germinal. Diferentes grupos de investigación han logrado inducir pluripotencia en distintas células somáticas y precursoras incluyendo fibroblastos, células de la médula ósea, células pancreáticas y células madre neuronales entre otras ([Takahashi & Yamanaka 2006](#), [Tat et al 2010](#)). También se han podido reprogramar células CD34⁺ así como linfocitos B y T aislados de sangre periférica, siendo una

fuentes fáciles y no invasivas de obtener células somáticas de pacientes ([Seki et al 2010](#)). Incluso recientemente se han podido generar iPSCs humanas a partir de células epiteliales de muestras de orina de pacientes ([Zhou et al 2012](#)). Desde un punto de vista metodológico, la investigación actual con iPSCs está enfocada al diseño de métodos rápidos y eficientes de reprogramación celular ([Cherry & Daley 2013](#)). La eficacia de este proceso es generalmente reducida, pero puede ser incrementada por la acción del protooncogen c-Myc a costa de aumentar la tumorigenicidad de las iPSCs. Desde la estrategia inicial basada en la utilización de cuatro factores de transcripción Oct-4, Sox2, Klf4 y c-Myc para generar iPSC (factores OSKM), se ha demostrado que la pluripotencia puede ser inducida por factores de transcripción alternativos o una combinación de algunos de ellos con diferentes moléculas farmacológicas ([Huangfu et al 2008a](#), [Huangfu et al 2008b](#)). Una aproximación diferente está basada en el uso de microARNs ([Anokye-Danso et al 2011](#), [Miyoshi et al 2011](#), [Sridharan & Plath 2011](#)). Chen y col., determinaron que tras el trasplante subdural combinado de iPSCs y fibrina, en un modelo de isquemia focal en ratas, se produjo una reducción considerable en el volumen de infarto y una mayor recuperación funcional en los animales examinada con el test rotarod ([Chen et al 2010](#)). El trasplante intracerebral de iPSCs tanto en el hemisferio afectado como el intacto en un modelo de isquemia focal en rata, indujo su diferenciación a células del linaje neural y una mejor respuesta de la función sensorimotora de los animales ([Jiang et al 2011](#), [Yuan et al 2013](#)). Sin embargo, no en todos los estudios donde se han empleado iPSCs se ha observado una recuperación funcional sustancial de los animales infartados ([Kawai et al 2010](#)). Si bien es cierto que las iPSCs son capaces de reemplazar las poblaciones neurales perdidas en el área infartada, restaurando en muchos casos la función dañada ([Jiang et al 2011](#), [Oki et al 2012](#)), deben de superarse sin embargo, otros problemas inherentes a su genotipo, como son las posibles mutaciones genéticas o la metilación aberrante en su ADN ([Gore et al 2011](#), [Lister et al 2011](#)), que han sido asociados a la formación de tumores, resultando incompatible con su traslación clínica ([Dihne et al 2011](#), [Kawai et al 2010](#)). La capacidad de las iPSCs para formar tumores “*in vivo*” se ha relacionado también con los métodos de reprogramación celular empleados. Se han utilizado estrategias de transducción génica no integrativas, basadas en vectores no-virales, mediante por ejemplo la transfección directa de proteínas recombinantes o ARNs mensajeros sintéticos. Sin embargo, la reprogramación celular mediante este tipo de aproximaciones es sumamente ineficaz y aunque es esperable una reducción de la tumorigenicidad de las iPSC, no se excluye completamente la posibilidad de que puedan formar tumores tras el implante ([Warren et al 2012](#), [Zhou et al 2009](#)).

Las células mononucleadas de médula ósea (BMMNCs) constituyen un grupo heterogéneo formado por células hematopoyéticas maduras (células B, células T, monocitos) y una pequeña proporción de células madre y progenitores hematopoyéticos, que junto con las células madre y progenitores de origen mesenquimal (MSCs), de las que se hablará a continuación, constituyen una prometedora vía terapéutica para el tratamiento de los desórdenes cerebrovasculares. La administración intravenosa o intracerebral de BMMNCs incrementa la neurogénesis ([Nakano-Doi](#)

[et al 2010](#), [Taguchi et al 2004](#)) y la plasticidad cerebral ([Shyu et al 2006](#)), además de favorecer el FSC en el tejido dañado (angiogénesis), creando un microambiente apto para la migración e integración de células neurales y el reemplazamiento del tejido perdido, favoreciendo la recuperación funcional de animales infartados. Sin embargo, se ha observado que el efecto terapéutico de las BMMNCs es menos duradero que el de las MSCs en un modelo de enfermedad vascular periférica ([Aranguren et al 2011](#)), lo que parece estar relacionado con la mayor capacidad de las MSCs con respecto a las BMMNCs, para promover fenómenos de angiogénesis y revascularización del tejido isquémico logrando una mejor acción terapéutica.

Las células madre mesenquimales (MSCs) constituyen una población de células no hematopoyéticas, caracterizadas por primera vez por Friedenstein y col. ([Friedenstein et al 1970](#)). Estas células pueden ser aisladas a partir de diversos tejidos incluyendo el tejido adiposo, cordón umbilical, hueso ([Erices et al 2000](#), [Gronthos et al 2000](#), [Lei et al 2014](#), [Meyer et al 2015](#)), y pueden diferenciarse a distintos fenotipos en función del microambiente que las contiene, fundamentalmente osteoblastos, condrocitos y adipocitos ([Ashton et al 1980](#), [Pereira et al 1998](#), [Pittenger et al 1999](#)). Uno de los tejidos que presenta mayor contenido de MSCs es la médula ósea ([Bianco 2014](#)) donde proporcionan, entre otras muchas funciones, señalización para la supervivencia y diferenciación de células madre y progenitores hematopoyéticos ([Gonzalez-Nieto et al 2012](#), [Jankowska et al 1982](#)). En 1999, Kopen y col. trasplantaron intra-ventricularmente en el cerebro de ratones MSCs marcadas con 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU). Las células implantadas migraron a distintas regiones del cerebro, incluyendo el cerebelo, corteza, estriado e hipocampo. En este estudio pionero, se demostró que parte de las MSCs implantadas eran capaces de diferenciarse a astrocitos ([Kopen et al 1999](#)). Lepsky y col., identificaron que 12 semanas después del trasplante intracerebral en ratas, de MSCs modificadas con el gen reportero que expresa la proteína fluorescente verde (GFP), estas células GFP⁺ expresaban a su vez marcadores de tipo astrocitario (GFAP) y neuronal (NeuN, MAP2 o β III tubulina) ([Lepski et al 2010](#)). Sin embargo, este mecanismo por el cual las MSCs podían actuar como células pluripotentes y diferenciarse a fenotipos neurales (trans-diferenciación) resulta sumamente ineficaz y de dudosa credibilidad. En línea con estas afirmaciones, algunos autores sostienen que los cambios morfológicos e inmunofenotípicos observados por Lepsky y Kopen entre otros, podrían ser explicados como el resultado de una doble dotación cromosómica, consecuencia de la fusión entre las células donantes (MSCs) y las diferentes estirpes neurales del organismo huésped ([Alvarez-Dolado et al 2003](#), [Terada et al 2002](#), [Wang et al 2003](#), [Ying et al 2002](#)). En base a estas afirmaciones, en la actualidad es ampliamente aceptado que el efecto neuroreparador de las MSCs se asienta en su capacidad secretora ([Hsuan et al 2016](#)).

Estos estudios preliminares ([Kopen et al 1999](#)) plantearon la posibilidad de usar esta población celular para el tratamiento de una gran variedad de desórdenes del sistema nervioso central (SNC). Los primeros ensayos preclínicos en los que se emplearon MSCs en modelos de infarto cerebral, fueron realizados por Li y col., aproximadamente hace casi dos décadas ([Li et al 2001a](#), [Li et al](#)

[2000](#)). En sus estudios trasplantaron intraestriatalmente MSCs extraídas de la médula ósea de ratones, aisladas en base a su capacidad adherente en cultivo, 4 días tras la cirugía isquémica. No se observaron fenómenos de inflamación derivados del implante celular, ni una marcada reducción del territorio cortical infartado al examinar las secciones coronales de cerebro con hematoxilina-eosina 1 mes tras la inducción del ictus. El hallazgo más relevante encontrado en los estudios de Li y col., fue la mejora en los déficits funcionales únicamente en los animales trasplantados unilateralmente con las MSCs, que fueron examinados con el test rotarod, y la escala de valoración neurológica modificada (NSSs), que evalúa el comportamiento asimétrico del animal ante un daño unilateral, examinando el deterioro motor, sensitivo y/o los reflejos del animal. Se observó una mejora en la coordinación y en el equilibrio de la extremidad parética un mes post-trasplante, concluyendo que el trasplante intraestriatal de MSCs, promovió una recuperación funcional parcial de los déficits derivados del ictus. Más tarde Chen y col., administraron sistémicamente MSCs en ratas isquémicas 24 horas y 7 días post-ictus ([Chen et al 2003b](#), [Chen et al 2001](#)), y sus resultados mostraron como la inyección intravenosa de MSCs mejoró significativamente los déficits funcionales derivados del infarto unilateral, empleando para ello los tests de coordinación sensorimotora descritos por Li y col., además del test del adhesivo que estimula el uso de ambas extremidades delanteras ([Freret et al 2009](#)). La inyección intravenosa diaria de BrdU, permitió identificar un marcado incremento en la proliferación celular localizado principalmente en regiones cercanas al núcleo del infarto, y siendo prácticamente ausente en el hemisferio contralateral. A su vez identificaron mediante tinciones inmunohistoquímicas, como en algún caso las células positivas para BrdU, también expresaban marcadores típicos de células de linaje neural (GFAP, NeuN y MAP2). En sus estudios Chen y col., sugirieron que la expresión constitutiva de interleuquinas y otras citoquinas a partir de las MSCs, podría favorecer la supervivencia, el crecimiento y/o la diferenciación de las células madre neurales endógenas, promoviendo mejoras en la recuperación funcional de los animales tratados.

Estos estudios pioneros realizados en modelos animales, sentaron un precedente para la intensa exploración de la capacidad neuroterapéutica de las MSCs ([Horie et al 2011](#), [Ishizaka et al 2013](#), [Mead et al 2014](#), [Scheibe et al 2012](#), [Shinozuka et al 2013](#)). Durante los últimos años, multitud de estudios han confirmado el efecto terapéutico de la administración de MSCs tras un episodio isquémico, identificando diferentes mecanismos de acción a través de los cuales las MSCs favorecen la supervivencia celular del territorio infartado (**Tabla 1.3.**), modulando la inflamación, disminuyendo la apoptosis del tejido lesionado, así como favoreciendo la angiogénesis, neurogénesis y sinaptogénesis ([Li et al 2016a](#)).

Tabla 1.3. Mecanismos de acción de las MSCs tras su administración en el ictus; efectos terapéuticos.

Mecanismos de acción	Factores que intervienen	Efecto terapéutico	Estudios
Inmunomodulación	↓ IL-1 β , IL-6, TNF- α , ↑ IL-10, IDO	Activa linfocitos T reguladores Inhibe activación de macrófagos, NK, y células presentadoras de antígeno	(Meisel et al 2004 , Zhu et al 2014)
Reducción de apoptosis	↓ IL-1 β , IL-6, TNF- α	Disminuye la actividad caspasa-3, y la producción de NO y Ca ⁺² intracelular, que inician la cascada apoptótica	(Leu et al 2010 , Zhu et al 2014)
Angiogénesis	↑ VEGF, bFGF, PGF, SDF-1	Incrementan el número de nuevos microvasos y se mejora la lesión neurovascular en la zona dañada	(Chen et al 2003c , Liu et al 2014a)
Neurogénesis	↑ NGF, BDNF, GDNF, EGF, bFGF, IGF-1, HGF, SCF	La liberación de citoquinas y factores neurotróficos, que estimulan la neurogénesis endógena	(Bao et al 2011 , Mora-Lee et al 2012 , Song et al 2013)
Sinaptogénesis	↑ GAP43, MBP	Favorece mecanismos de plasticidad, estimulando la expresión de vesículas sinápticas, incrementando el brote axonal y la remodelación de la mielina	(Li et al 2006b , Liu et al 2010 , van Velthoven et al 2012)

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos; PGF: factor de crecimiento placentario; IL- interleuquinas; TNF- α : factor de necrosis tumoral- α ; IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa; SDF-1: factor derivado de célula estromal 1; NGF: factor de crecimiento nervioso; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; GDNF: factor neurotrófico derivado de glia; EGF: factor de crecimiento epidérmico; IGF-1: factor de crecimiento insulínico 1; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; SCF: factor de la célula madre; GAP43: proteína de membrana axonal 43; MBP: proteína básica de mielina NK: células "Natural killer".

La inmunomodulación del microambiente inflamatorio después del ACV, resulta de vital importancia para minimizar el daño y promover la recuperación ([Burns et al 2009](#)), puesto que se ha propuesto que la inhibición de los procesos inflamatorios derivados del ictus, promueve la neurogénesis endógena ([Hoehn et al 2005](#)). En concreto, las MSC/P participan en la regulación del fenotipo glial tras el daño isquémico, favoreciendo su diferenciación hacia el tipo M2 ([Hegyi et al 2014](#), [Ohtaki et al 2008](#)). La microglía tipo M1, es la primera en responder a la lesión pudiendo inducir neurotoxicidad debido a la liberación de factores pro-inflamatorios que incrementan la inflamación. Por el contrario la microglía M2, tienen un potencial amortiguador de las respuestas inmunitarias pro-inflamatorias, promoviendo además la expresión de genes de reparación ([Tang & Le 2016](#)). En un modelo de trauma inducido, la inyección interventricular de MSC/P moduló la diferenciación del fenotipo glial M2, promoviendo la reparación tisular ([Zanier et al 2014](#)). Además, el trasplante de MSC/P no solo se ha asociado con una inhibición de la inflamación, sino también con una reducción de la cicatrización ([Li et al 2005](#)).

Meisel y col., realizaron ensayos in vitro en los que co-cultivaron linfocitos T y MSCs ([Meisel et al 2004](#)). Observaron como la producción de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) a partir de las MSCs, se encontraba modulada en dosis dependiente por la presencia de INF- γ , citoquina inmunitaria producida por linfocitos T tipo NK ("*Natural killer*"), y a su vez la IDO, mediaba la inhibición de la proliferación de células T inflamatorias. Zhu y col., demostraron como la inyección intravenosa de MSCs pocos minutos después de la inducción de la isquemia en conejos, indujo una reducción en la expresión de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , y un incremento de la expresión de IL -10, modulando el balance de expresión de citoquinas pro y anti-inflamatorias ([Zhu et al 2014](#)). Por otro lado, la IL-1 β promueve la síntesis de óxido nítrico y la concentración de calcio intracelular, que conducen a la muerte neuronal, por lo que la reducción de su expresión mediada por MSCs, protege al cerebro frente a procesos apoptóticos ([Zhu et al 2014](#)). En un modelo de infarto subcortical en ratas, Leu y col., determinaron que los niveles de expresión de caspasa 3, normalmente elevados tras el infarto, se veían reducidos tras la inyección intravenosa de MSCs durante las primeras 24 horas post-ictus ([Leu et al 2010](#)). Adicionalmente observaron como la expresión de SDF-1, quimioatrayente, entre otras, de células endoteliales, se vio incrementado tras la administración de MSCs, lo que favoreció la angiogénesis del tejido dañado, y la perfusión del mismo.

La angiogénesis en regiones peri-infartadas juega un papel crucial en la supervivencia y regeneración del tejido dañado, puesto que tras el ictus, la destrucción de poblaciones neurales, la falta de oxígeno y nutrientes en la región de daño, constituyen un microambiente hostil para la viabilidad celular ([Savitz et al 2004](#)). Se ha observado, como el número de células progenitoras endoteliales circulantes aumenta tras el ictus, lo que se relaciona con un mejor pronóstico ([Chu et al 2008](#)). La administración intravenosa de MSCs en un modelo de infarto focal en ratas, incrementó los niveles de VEGF en el tejido isquémico, observando un desarrollo significativo en la microvasculatura del hemisferio infartado, con respecto a los animales inyectados con una solución salina ([Chen et al 2003c](#)). Esta vía de administración celular, también se ha demostrado que promueve un incremento en los niveles de expresión de diversos factores de crecimiento y citoquinas, como EGF, bFGF y GDNF, relacionadas con el rescate de la microvasculatura afectada ([Wakabayashi et al 2010](#)). Liu y col., realizaron co-cultivos de células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVEC) y MSCs, para demostrar la capacidad de estas últimas para reparar el daño isquémico inducido en las HUVEC como consecuencia de la privación de glucosa y oxígeno (OGD) ([Liu et al 2014a](#)). Concluyeron, que tanto la protección como reparación de las células endoteliales dañadas, se realizó a través de la transferencia mitocondrial desde las MSCs hacia las HUVEC, que estuvo mediada por estructuras nano-tubulares. El rescate de la respiración aeróbica de las células expuestas a OGD, indujo una protección frente a la apoptosis celular observada en aquellos cultivos que no fueron cultivados en presencia de las MSCs, sugiriendo en su trabajo que el injerto de MSCs en afecciones vasculares isquémicas podría mediar el rescate de las células endoteliales dañadas, no sólo a través de su efecto paracrino, sino también a través de la transferencia mitocondrial.

Tras el daño isquémico, se ha demostrado que se produce una migración de neuronas inmaduras (doblecortina positivas; DCX⁺) desde sus nichos neurogénicos (SVZ), hacia zonas de penumbra isquémica, desviándose de su ruta habitual hacia el bulbo olfatorio ([Arvidsson et al 2001](#), [Parent et al 2002](#)). La secreción de factores neurotróficos a partir de las MSCs, demostrada en co-cultivos con neuronas corticales hipóxicas ([Tate et al 2010](#)), podría favorecer la neurogénesis endógena de una forma más activa ([Savitz et al 2004](#)). En este sentido, Mora-Lee y col., asociaron el trasplante intraestriatal de MSCs 48 horas después del infarto trombolítico en ratones, a un incremento en la neurogénesis endógena del cerebro, determinada en base a un incremento en la proliferación observado con BrdU, y un aumento significativo de células DCX⁺ en regiones cercanas al núcleo del infarto, además de con un incremento en la vascularización de la zona dañada y una menor cicatriz glial ([Mora-Lee et al 2012](#)). Es conocido, que las MSCs sometidas a condiciones de hipoxia, incrementan la secreción de factores como BDNF, VEGF o eritropoyetina, lo que favorecen su supervivencia en el microambiente isquémico cerebral ([Hu et al 2008](#), [Theus et al 2008](#)), y su trasplante intracortical tras la inducción del infarto unilateral en ratones, incrementa la formación activa de neuroblastos (células DCX⁺) desde la región SVZ ipsilesional, y su migración hacia la zona de daño ([Song et al 2013](#)).

Otros estudios han demostrado que el trasplante de MSCs favorece la plasticidad neuronal en base al incremento de nuevas sinapsis en el hemisferio contra ([Liu et al 2011](#)) e ipsi-lesionado ([Li et al 2006b](#)) de animales infartados, determinando el contenido en GAP43 (proteína de membrana axonal 43) y/o mediante trazadores trans-sinápticos fluorescentes. Van Velthoven y col., describen como la inyección intracerebral de MSCs, incrementa el número de nuevos axones (brotación axonal) y la formación de vainas de mielina, potenciando la plasticidad axonal y la reconstrucción de los circuitos neuronales dañados ([van Velthoven et al 2012](#)). En sus estudios observaron que la proteína básica de mielina (MBP) disminuía drásticamente tras el daño isquémico. En aquellos animales trasplantados intracerebralmente con las MSCs, se observó un incremento en los niveles inmunohistoquímicos de esta proteína 21 días post-trasplante, alcanzando valores similares a los observados en animales no isquémicos, siendo especialmente relevante en las fibras del cuerpo caloso (CC). Por otro lado, la inyección de dextrano amino biotinilado (DBA), molécula absorbida por el soma de las neuronas y que es transportado de forma anterógrada hacia los terminales axónicos, permitió el análisis detallado de la conectividad ipsilateral entre el hemisferio dañado y el sano, observando cómo en el caso de los animales trasplantados con las MSCs, la cantidad de fibras que cruzan a través del CC fue similar a la de los ratones no isquémicos e inferior en ambos casos a la de los ratones con daño cortical. Concluyeron que el tratamiento con las MSCs, favoreció la recuperación del tracto corticoespinal implicado en la transmisión del movimiento voluntario ([Fromm & Evarts 1982](#)), recuperando las conexiones que el daño isquémico reduce en la conectividad entre la corteza motora y la médula espinal contralateral ([van Velthoven et al 2010](#)), y disminuyendo las nuevas conexiones aberrantes que se producen entre ambas cortezas a nivel del cuerpo caloso. La brotación axonal mediada por las MSCs, restaura las conexiones

dañadas tras el daño isquémico, mejora la supervivencia de regiones peri-infartadas, y contribuye a la recuperación funcional ([Liu et al 2010](#), [Song et al 2013](#), [van Velthoven et al 2013](#)), sin embargo hasta el momento los mecanismos moleculares por los que las MSCs inducen dicha plasticidad sináptica, son aún poco conocidos ([Li et al 2016a](#)).

Recientes estudios postulan que además de la acción paracrina de las MSCs a través de diferentes factores de crecimiento y citoquinas, éstas células producen vesículas extracelulares (exosomas) en cuerpos multi-vesiculados, que transportan distintos mRNAs y proteínas que actúan como mediadores paracrinicos en la reparación de tejidos ([Lopez-Verrilli et al 2016](#), [Phinney & Pittenger 2017](#)). El mecanismo de acción de los exosomas se basa en la transferencia horizontal de mRNAs, miRNAs y proteínas que alteran la funcionalidad de las células diana, observándose como los exosomas derivados de MSCs estimulan el crecimiento axonal en cultivos de neuronas corticales ([Zhang et al 2017](#)), y promueven la angiogénesis en células endoteliales en cultivo. Su administración intravenosa en un modelo de infarto cortical en ratas, ha mostrado un incremento en la densidad axonal entre regiones corticales contralaterales 14 días después del tratamiento, lo que se asoció a la recuperación funcional observada mediante tests de coordinación sensorimotora (test del adhesivo y el test de la rejilla ([Xin et al 2013](#)). Xin y col., determinaron que el miR-133b presente en los exosomas de las MSCs, regula la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) en astrocitos, implicado en la formación de la cicatriz glial, y la expresión de RhoA en el hemisferio lesionado, proteína de la familia de las GTPasas que regula el desarrollo morfológico y la reorganización del citoesqueleto de actina en las neuronas adultas.

En términos de eficacia terapéutica, actualmente se desconoce la ruta o vía de administración por la que las MSCs promueven una mayor recuperación tras el daño isquémico cerebral ([Rodriguez-Frutos et al 2016](#)) (**Tabla 1.4.**). La administración intravenosa de MSCs resulta comparable a la intra-arterial ([Gutierrez-Fernandez et al 2011](#)), y en ambos casos se ha observado de forma general una reducción en el tamaño de la lesión y una mejora de la función sensorimotora de los animales ([Gutierrez-Fernandez et al 2013](#), [Leu et al 2010](#)). Sin embargo, una de las principales limitaciones de ambas rutas de administración lo constituye la reducida migración de las células implantadas hacia el cerebro, haciendo que la mayor parte de las células sistemicamente trasplantadas queden retenidas en distintos tejidos y órganos (pulmón, riñón, hígado) disminuyendo así su efecto terapéutico ([Boltze et al 2015](#)). Adicionalmente, la administración sistémica presenta riesgos de microembolias relacionados con el tamaño celular, la velocidad de administración ([Cui et al 2015](#), [Ge et al 2014](#)), y con la adhesión célula-célula ([Zhang et al 2015a](#)).

Tabla 1.4. Rutas de administración y mecanismos de acción de las MSCs en el ictus, y sus efectos terapéuticos. Se muestran algunos ejemplos representativos en el campo.

	Modelo animal y Ventana temporal de aplicación	Mecanismo de acción	Efecto terapéutico (evaluación post-ictus)
Intra-arterial/venosa	MCAO ratas 24 horas (Li et al 2001b)	↑ neurogénesis	X ~ volumen de infarto (HE) ✓ Mejora funcional (escala NSS, test del adhesivo)
	MCAO ratas 24 horas (Chen et al 2001)	↑ neurogénesis	1 mes: ✓ ↓ volumen de infarto (HE) ✓ Mejora funcional (test adhesivo, rotarod y escala de NSS)
	MCAO ratas 24 horas (Chen et al 2003b)	↓ apoptosis ↑ neurogénesis	2 semanas: ✓ ↓ volumen de infarto (HE) ✓ Mejora funcional (test adhesivo, rotarod y escala de NSS)
	MCAO ratas 24 horas (Leu et al 2010)	↓ apoptosis ↓ inflamación ↑ angiogénesis ↑ neurogénesis	2 semanas: ✓ ↓ volumen de infarto (TTC) ✓ Mejora funcional (test de "corner")
	dMCAO ratón 24 horas (Wei et al 2013)	↓ apoptosis	4 días: ✓ ↓ volumen de infarto (TTC) ✓ Mejora funcional (test adhesivo)
Intra-nasal	dMCAO ratón 72 horas (van Velthoven et al 2013)	↑ neurogénesis	1 mes: ✓ ↓ volumen de infarto (Nissl) ✓ Mejora funcional (test adhesivo y del cilindro)
	pMCAO rata 72 horas (Inoue et al 2013)	↑ neurogénesis	2 semanas: ✓ ↓ volumen de infarto (HE) ✓ Mejora funcional (escala NSS)
	Ictus hemorrágico ratón 3-7 días (Sun et al 2015a)	↑ neurogénesis	2 semanas: ✓ Recuperación funcional (escala NSS, rotarod, test del adhesivo y test de locomoción)
	MCAO transitoria; rata 24 horas (Zhao et al 2015)	↑ angiogénesis	2 semanas: X ~volumen de infarto (HE) ✓ Mejora funcional (escala NSS, test de la rejilla)
Intra-cerebral	MCAO ratón 4 días (estriado) (Li et al 2000)	↑ neurogénesis	1 mes: X ~volumen de infarto (HE) ✓ Mejora funcional (escala NSS y rotarod)
	MCAO rata 3 días (estriado) (Bao et al 2011)	↑ angiogénesis ↑ neurogénesis ↓ apoptosis	3 meses: ✓ ↓ volumen de infarto (HE) ✓ Mejora funcional (escala NSS y test del adhesivo)
	Fototrombosis ratón 2 días (estriado) (Mora-Lee et al 2012)	↑ angiogénesis ↓ inflamación y cicatriz glial ↑ neurogénesis	1 mes: ✓ ↓ volumen de infarto (Acetato de tionina)
	MCAO transitoria ratón 72 horas (estriado) (van Velthoven et al 2012)	↑ mielinización ↓ conectividad aberrante	3 semanas: ✓ ↓ volumen de infarto (RMN, HE) ✓ Mejora funcional (test del cilindro)
	dMCAO ratón 1-7 días (CX peri-ictus) (Song et al 2013)	↓ inflamación y cicatriz glial ↑ angiogénesis ↑ neurogénesis ↑ sinaptogénesis	1 mes: ✓ ↓ volumen de infarto (TTC; 72h post-ictus) ✓ Mejora funcional (test de "corner")

MCAO/dMCAO/pMCAO: oclusión de la arteria cerebral media/ a nivel distal/ a nivel proximal; HE: hematoxilina/eosina; TTC: cloruro 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolio; escala NSS: escala de valoración neurológica modificada; RMN: resonancia magnética nuclear; CX: cortex cerebral

La ruta intranasal representa una vía de administración terapéutica alternativa ([Rodríguez-Frutos et al 2016](#)) que favorece el implante no invasivo de células madre en el SNC ([Chapman et al 2013](#)). Las células administradas por esta vía, deben atravesar las células epiteliales que componen los conductos nasales y la mucosa, lugar de entrada al cerebro que se encuentra en la periferia del mismo, hasta alcanzar la región del SNC donde se pretende su efecto terapéutico ([Lochhead & Thorne 2012](#)). Un estudio realizado en roedores, mostró como la mayoría de las células administradas por esta vía fueron capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) en menos de una hora, localizándose mayoritariamente en el bulbo olfatorio, aunque también en el tálamo, hipocampo y en el cortex cerebral ([Danielyan et al 2009](#)). Sin embargo, la activación del barrido mucociliar (BM), primera línea de defensa inmunológica del epitelio respiratorio y compuesto por el moco o fluido periciliario y el movimiento coordinado de las células ciliadas, atrapa las partículas inhaladas (o células) y las propulsa hacia el tracto gastrointestinal para su eliminación ([Antunes & Cohen 2007](#)), lo que supone incrementar las dosis celulares para obtener un efecto terapéutico aceptable ([Lochhead & Thorne 2012](#)). Por otro lado, se desconoce si en la práctica clínica, la función inmunológica del tejido mucoso intranasal y la distancia migratoria (relativamente más larga que en roedores), podría comprometer la eficacia terapéutica de esta vía de administración, habiéndose testado únicamente en modelos animales ([Boltze et al 2015](#)).

Por último, el trasplante intracerebral de MSCs representa sin duda una ruta más directa para la acción terapéutica. Tras el ACV, la producción de proteínas quimioatrayentes regulada por la hipoxia como el SDF1, a partir de macrófagos derivados de monocitos ([Tu et al 2016](#)), resulta esencial en la migración de las células hacia el encéfalo ([Borlongan et al 2015](#)). Los niveles de estas proteínas quimioatrayentes se eleva dentro de los primeros días post ictus, reduciendo la ventana temporal de acción de las células terapéuticas, cuando éstas son administradas sistémicamente, a la fase aguda del ictus. Es por ello, que aun tratándose de un método de administración más invasivo, el trasplante intracerebral se presenta como una ruta alternativa en el tratamiento del ictus tanto en fase aguda como crónica de la enfermedad ([Borlongan et al 2015](#)). Entre sus inconvenientes, se presenta el daño derivado de la propia intervención quirúrgica ([Rodríguez-Frutos et al 2016](#)), que podría derivar en convulsiones, exacerbación psicomotora o hematomas subdurales crónicos ([Wu et al 2015b](#)), por lo que en la actualidad se trata de la vía de administración menos usada en la clínica ([Savitz et al 2005](#)), pese a que se ha demostrado su seguridad ([Savitz et al 2005](#), [Steinberg et al 2016b](#), [Suarez-Monteagudo et al 2009](#)), y un reciente meta-análisis realizado en base a los resultados obtenidos en ensayos preclínicos presenta esta vía como la de mayor efectividad frente a la intra-arterial e intra-venosa ([Vu et al 2014](#)).

En el contexto clínico, hasta la actualidad se han realizado estudios empleando las diferentes vías de administración indicadas anteriormente, y la obtención de las MSCs se ha realizado a partir de diversas fuentes de tejido. Uno de los primeros ensayos clínicos en pacientes con ictus fue realizado por Bang y col., demostrando que el trasplante autólogo de MSCs, además de constituir un procedimiento seguro, redujo parcialmente los déficits neurológicos derivados del daño

isquémico, en una gran mayoría de los pacientes ([Bang et al 2005](#)). Sin embargo, el reducido número de sujetos participantes y la exclusión de individuos control a lo largo de los 10 meses de duración del ensayo, ha hecho que algunos autores plantearan dudas sobre las conclusiones obtenidas en este primer trabajo ([De Keyser 2005](#)). En un nuevo estudio con un mayor tamaño muestral, Bang y col. incluyeron pacientes de edades comprendidas entre los 30 y 75 años, confirmando nuevamente la seguridad de esta ruta de administración terapéutica; sin embargo en este nuevo ensayo no se encontraron evidencias de una mejoría funcional significativa examinada con el índice de Barthel (IB) y la escala modificada de Rankin (mRS), en aquellos pacientes tratados con MSCs ([Lee et al 2010a](#)). Años más tarde, Bhasin y col., confirmaron nuevamente la viabilidad y seguridad de la inyección intravenosa de MSC autólogas en pacientes con ictus crónicos, encontrando diferencias significativas en la recuperación funcional de los pacientes tratados con MSCs examinada con el índice de Barrel ([Bhasin et al 2013](#)). En otro estudio se emplearon inyecciones intravenosas seriadas de MSC y MSC+NSC ([Qiao et al 2014](#)), no detectándose ni infecciones neurológicas ni formación de tumores ni otros efectos adversos de consideración, a lo largo de 2 años de seguimiento. Los pacientes implantados mostraron una gradual recuperación de las funciones neurológicas, empleando las escalas neurológicas de IB y mRS, después de la primera, segunda o tercera inyección intravenosa. Sin embargo el número reducido de pacientes incluido en este estudio (8 individuos) limita las conclusiones del mismo.

El número de ensayos clínicos en los que las MSCs se han administrado intracerebralmente, es realmente escaso y el número de pacientes empleados en cada estudio es también reducido ([Savitz et al 2005](#), [Steinberg et al 2016b](#), [Suarez-Monteagudo et al 2009](#)). En los estudios de Savitz y de Steinberg se incluyeron a 12 y 18 pacientes respectivamente, con edades comprendidas entre los 25 y 60 años de edad, que presentaban déficits neurológicos (principalmente motores) de consideración, derivados de infartos en los ganglios basales y/o infartos masivos. En ambos estudios algunos pacientes trasplantados mostraron crisis epilépticas, hematomas subdurales y/o síncope, que en principio no se relacionaron con el implante celular. En estos ensayos, se registró una recuperación funcional parcial en la mayor parte de los pacientes, cuando fueron examinados, entre otros, mediante el índice de valoración neurológica NIHSS. Una de las limitaciones del trabajo de Steinberg y col. ha sido atribuida al fenotipo celular empleado; MSCs modificadas genéticamente (línea celular SB623), que sobreexpresan factores de crecimiento fibroblástico 1 y 2, ([Tate et al 2010](#)), favoreciendo así la neurogénesis. Sin embargo el uso clínico de estas células según Ian A. Clark, debe ser tomado con cautela ([Clark 2016](#)), debido que en comparación con las MSCs nativas, se ha demostrado que inducen la producción de células linfoides productoras de IL-10, y presentan un mayor índice de senescencia ([Dao et al 2011](#)), unas afirmaciones no compartidas por Steinberg y col., que han enfatizado el carácter inmunomodulador y supresor de respuesta inflamatoria asociado a las características terapéuticas de esta población celular ([Steinberg et al 2016a](#)).

En resumen, los resultados clínicos obtenidos en el pasado, independientemente de la ruta de administración, han demostrado la seguridad y tolerabilidad del implante de MSCs en pacientes con ictus, y en aunque en menor medida, también el potencial terapéutico de esta población celular en el tratamiento de los ACV. Resulta evidente la necesidad de contar con un mayor número de ensayos clínicos, que empleen un mayor número de pacientes en cada estudio y reducir así la heterogeneidad de los sujetos participantes en base a mejores criterios de inclusión/exclusión, para obtener una mayor información tanto de las rutas, como de las dosis de administración, con mayor rendimiento terapéutico ([Bliss et al 2010](#)). Por otro lado, se requiere un mayor número de estudios pre-clínicos para profundizar en los mecanismos neuro-terapéuticos de las MSCs. La modesta recuperación funcional observada en los estudios preclínicos y clínicos, podría tener su origen en que las células implantadas sistémica- e intra-nasalmente no migren al tejido cerebral con toda la eficacia requerida, o en el caso del implante intra-cerebral, podría relacionarse con una progresiva dispersión y elevada mortalidad de las células trasplantadas en el tejido cerebral ([Bakshi et al 2005](#), [Bliss et al 2007](#), [Coyne et al 2007](#), [Coyne et al 2006](#)), dado que tras el ictus se produce un microambiente hostil para el propio tejido cerebral y la supervivencia y retención de las células implantadas ([Liu et al 2014b](#)).

1.4. Terapia celular asistida. Beneficios de la utilización de Biomateriales en intervención neurorestaurativa.

El uso de biomateriales en neurociencia neurorregenerativa ha crecido sustancialmente en las últimas dos décadas, proporcionando ejemplos de cómo la integración de células y/o factores neurotróficos en biomateriales de distinto formato y composición promueve en animales una mejor recuperación funcional respecto al implante terapéutico de células sin el biomaterial ([Nih et al 2016](#), [Orive et al 2009](#), [Pakulska et al 2012](#)). Cualquier biomaterial de elección debería proporcionar un microambiente adecuado para la supervivencia de las células implantadas, favoreciendo la integración (“*engraftment*”) del injerto en el tejido huésped ([Ballios et al 2015](#), [Hoban et al 2013](#), [Jendelova et al 2016](#), [Nih et al 2016](#)). Una de las primeras aproximaciones en el uso de biomateriales para aplicaciones *in vivo* vinieron de los estudios de Yannas y Burk ([Yannas & Burke 1980](#)). En sus estudios, realizaron implantes de piel en cobayas empleando membranas de colágeno, y observaron una limitada respuesta inflamatoria que fue detectada al observar células mono y polinucleadas empleando tinción de hematoxilina eosina. Esta reacción inmune al trasplante pudo ser minimizada, realizando el entrecruzamiento del colágeno con otras moléculas como el glucosamínoglicano. En esos años, Vacanti y col. cultivaron hepatocitos en matrices tridimensionales de un polímero compuesto de poliglactina, poliortoéster y polianhídrido biodegradable, para su posterior trasplante hepático en ratones, demostrando que los hepatocitos permanecían viables hasta 14 días después del implante *in vivo* ([Vacanti et al 1988](#)). Ambos estudios abrieron el campo de la ingeniería de tejidos.

Los primeros biomateriales utilizados en aplicaciones sobre tejido cerebral fueron ensayados hace casi más de tres décadas por Woerly y col., que emplearon hidrogeles formados por materiales sintéticos, compuestos de 2-polihidroximetilmetacrilato (pHEMA) y 2-poliglicerolmetacrilato (pGMA), para su posterior implante intracerebral. En sus estudios, detectaron la presencia de astrocitos reactivos en el interior de los hidrogeles, confirmando una fuerte astrogliosis posiblemente debida a la inyección del material en estado previo de gel y a la naturaleza de los materiales empleados ([Woerly et al 1995](#), [Woerly et al 1990](#)). Lesny y col. replicaron los ensayos de Woerly, empleando los mismos polímeros compuestos y confirmando nuevamente cómo los hidrogeles fueron colonizados por poblaciones de astrocitos reactivos hasta 8 semanas después del implante ([Lesny et al 2002](#)). Basándose en la capacidad de las células gliales de introducirse en el interior de los hidrogeles, postularon que en base a su porosidad, hidrofobicidad y estabilidad, estos polímeros podrían combinarse con distintas poblaciones celulares, constituyendo una alternativa viable en la regeneración tisular en comparación con el injerto de biomateriales por si solos.

La capacidad de integrar distintos fenotipos celulares en su interior, es una propiedad característica de los hidrogeles basada en su estructura porosa, cuyo tamaño de poro puede ser modulado, permitiendo controlar la difusión de moléculas a través de ellos y la movilidad celular en su interior ([Nih et al 2016](#)). Por otro lado, el grado de reticulación de los hidrogeles, es decir, la disposición de las cadenas poliméricas en una red tridimensional, permite moldear sus propiedades mecánicas, permitiendo que sean flexibles como los tejidos blandos, rígidos como el cartílago o hueso, o elásticos para imitar a la piel o los vasos sanguíneos ([Aurand et al 2012](#)). Esta capacidad de moldear el grado de reticulación, permite la obtención de hidrogeles con propiedades mecánicas cercanas a las del tejido cerebral ([Leach et al 2007](#), [Murphy et al 2012](#), [Tang-Schomer et al 2014b](#)). Por otro lado, lo que los hace tan atractivos en terapia neuro-restaurativa, es su capacidad de gelificación *in situ*, minimizando el posible daño ocasionado por el implante del material en estado previo de gel ([Nih et al 2016](#)). La gelificación *in situ* resulta compatible con una intrincada estructura cerebral, actuando como una matriz extracelular adecuada para la integración de células, permitiendo su crecimiento y diferenciación dentro de una red compleja ([Wang & Spector 2009](#)). Con el fin de mantener la funcionalidad celular y estimular la reparación de los circuitos neuronales, los hidrogeles deberían de facilitar el flujo de nutrientes y desechos metabólicos hacia y desde el interior de los mismos. Una vez concluido el efecto terapéutico, los hidrogeles deberían poder degradarse en sub-productos que no originen citotoxicidad o desencadenen respuestas inflamatorias ([Peppas & Khademhosseini 2016](#)).

La terapia combinada de células integradas en matrices de hidrogeles en modelos pre-clínicos de neuro-restauración se remonta a las últimas dos décadas ([Boisserand et al 2016](#)), y los biomateriales ensayados, se han basado en polímeros naturales, sintéticos o en la combinación de ambos ([Dalton & Mey 2009](#), [Potter et al 2008](#)). La posibilidad de integrar células en hidrogeles para su posterior co-trasplante, es una estrategia que favorece la supervivencia y retención de las células trasplantadas tanto cuando el material es inyectado en el interior de la cavidad isquémica ([Cook et al 2017](#), [Jin et al 2010a](#), [Massensini et al 2015](#), [Nih et al 2017](#), [Zhong et al 2010](#)), como cuando el trasplante se realiza en regiones peri-infartadas ([Ghuman et al 2016](#)), de forma superficial sobre la región afectada ([Ito et al 2017](#)) o en el espacio subdural ([Bible et al 2009](#), [Osanai et al 2010](#), [Wang et al 2012](#)) (**Figura 1.4.**).

Figura 1.4. Posibles estrategias para la aplicación de biopolímeros de hidrogeles en combinación con células terapéuticas en terapia neuro-restaurativa. Se muestra algunas estrategias empleadas en el co-trasplante cerebral. En rojo pálido se ilustra la zona ficticia de daño restringida en este ejemplo a la corteza cerebral. *Modificada de* ([Boisserand et al 2016](#)).

Uno de los primeros estudios preclínicos que puso de manifiesto los beneficios del co-trasplante de células integradas en hidrogeles, fue el de Park y col., en un modelo de ictus isquémico en ratones con fondo genético CD-1 ([Park et al 2002](#)). El trasplante intracerebral de NSCs cultivadas sobre matrices de ácido poliglicólico (PGA) en el interior de la cavidad isquémica 7 días después de la inducción del infarto cerebral, redujo la pérdida de tejido cerebral, en comparación con el trasplante de células o del biomaterial por si solos. Por otro lado la inflamación infiltrante en el interior de los complejos de PGA-NSCs y la neo-vascularización adyacente, pusieron de manifiesto la capacidad de difusión de nutrientes a través de la matriz polimérica. Aunque en este trabajo no se examinó la evolución funcional de los animales, ni se obtuvo información sobre los beneficios del tratamiento con NSCs o PGA por si solos, el estudio sentó un precedente en el co-trasplante de biomateriales y células terapéuticas en modelos de daño cerebral.

Desde entonces, se han incrementado los esfuerzos en la búsqueda de biomateriales compatibles con el tejido cerebral, empleando diferentes modelos experimentales para explorar su capacidad en terapia neurorestaurativa. En 2005, Hou y col., trasplantaron ácido hialurónico (HA) sólo y modificado con laminina en el interior de una cavidad realizada quirúrgicamente en la corteza cerebral de ratas ([Hou et al 2005](#)). Demostraron, como el implante único de HA o combinado con laminina, redujo la cicatriz glial y la infiltración inflamatoria, favoreciendo a su vez la revascularización de la zona escindida. Deguchi y col., emplearon matrices porosas de gelatina modificada con siloxano, cargadas con factores de crecimiento (BDNF y EGF) que fueron trasplantadas inmediatamente después de la inducción quirúrgica de una lesión en el cortex de ratas, o 1 mes después del daño cerebral ([Deguchi et al 2006](#)). Dos meses después del trasplante del biomaterial cargado con los factores de crecimiento mencionados, observaron la formación de tejido cicatrizante circundante, cuantificando la presencia de células endoteliales vasculares (NAGO), astrocitos (GFAP) y microglía (Iba1) en la zona dañada, y describieron como la gelatina no promovió fenómenos inflamatorios de consideración en comparación con los animales no trasplantados.

En los últimos años se han desarrollado nuevos modelos avanzados de terapia experimental de ictus (**Tabla 1.5.**), incrementándose el número de biomateriales ensayados en combinación con distintas estirpes celulares y/o factores de crecimiento (**Tabla 1.6.**).

Tabla 1.5. Modelos experimentales de infarto cerebral ([Carmichael 2005](#), [Macrae 2011](#))

Modelo	Ventajas	Limitaciones
Oclusión intraluminal de la MCA con filamento	Infartos de extensión variable en función del tiempo de oclusión (transitorio o permanente)	Riesgos de hemorragias y elevada mortalidad.
Fototrombosis	Restricción del infarto a la zona de estudio, escasa mortalidad.	Requiere de la inyección de un agente químico (rosa de bengala) y una craneotomía.
Inyección de endotelina (vasoconstricción)	Puede ser llevado a cabo sin inducir un estado de anestesia en el animal.	Variabilidad en el tiempo de constricción y no es específico sobre la vasculatura cerebral.
Infartos espontáneos en animales hipertensos modificados genéticamente.	Los animales desarrollan la hipertensión sin necesidad de intervenciones quirúrgicas	Variabilidad en la región dañada (corteza y/o subcorteza) y posibles anomalías en el cerebro
Oclusión de la arteria cerebral media a nivel proximal (pMCAO)	Escasa mortalidad	Requiere craneotomía. Variabilidad e infartos de gran tamaño con afectación cortical y subcortical.
Oclusión de la arteria cerebral media a nivel distal (dMCAO)	Infartos muy reproducibles de pequeño tamaño con afectación cortical. Escasa mortalidad.	Requiere craneotomía. Déficits sensorimotrices limitados, dificultad en evaluación.

MCA: Arteria cerebral media; pMCAO: oclusión de la arteria cerebral media a nivel proximal; dMCAO: oclusión de la arteria cerebral media a nivel distal.

Jin y col. demostraron, en un modelo de ictus focal en ratas, que el trasplante en el interior de la cavidad isquémica de NSCs combinadas con matrigel 72 horas post-ictus, indujo una reducción significativa del tamaño del infarto y la recuperación funcional parcial de los animales, que fue examinada mediante test sensorimotrices y cognitivos ([Jin et al 2010a](#)). Además, la supervivencia y diferenciación de las NSCs trasplantadas hacia células neurales maduras, fue favorecida en presencia del biomaterial, adquiriendo propiedades electrofisiológicas (potenciales de acción en reposo, y corrientes post-sinápticas excitatorias) características de neuronas terminalmente diferenciadas. Entre las limitaciones de este estudio, se encuentran el uso de un polímero derivado de sarcoma de ratón (matrigel) sin posibilidad de traslación clínica y la falta de análisis sobre la evolución temporal de la recuperación funcional.

Tabla 1.6. Biomateriales ensayados en combinación con células y/o factores de crecimiento (FC) en terapia neurorestaurativa.

Modelo animal	Biomaterial (ventana temporal de aplicación)	Efecto terapéutico	Referencias
CCAO ratón	PGA - NSCs (7 días)	↑ Proyecciones axonales interhemisféricas (DIL + BDA) ↓ Inflamación y de la cicatriz glial (GFAP ⁺ , HE)	(Park et al 2002)
MCAO rata	PLGA - NSCs PLGA – VEGF (2 semanas)	↓ Volumen de infarto (MRI) ↑ Neurogénesis (NeuN, GFAP) ↓ Respuesta inflamatoria post-trasplante (CD11b) ↑ Neovascularización favorecida por VEGF (RECA1, Col IV)	(Bible et al 2009, Bible et al 2012b)
dMCAO rata	Matrigel – NSCs (3 semanas)	↓ Volumen de infarto (HE) ↑ Supervivencia y diferenciación NSCs trasplantadas (NeuN, MAP2, y registros electrofisiológicos) ↓ Déficits sensoriomotrices (test de la rejilla y del adhesivo) y cognitivos (test del laberinto en Y)	(Jin et al 2010a)
MCAO rata	Col I - NSCs (post-ictus)	↑ Supervivencia y diferenciación NSCs trasplantadas (Tau, BrdU) ↑ Sinaptogénesis (MET) ↓ Déficits sensoriomotrices (escala NSS)	(Yu et al 2010)
MCAO rata	ECM – NSCs (2 semanas)	↑ Formación de nuevo tejido.	(Bible et al 2012a)
Fototrombosis ratón	iPS-NSCs – HA (1 semana)	↓ Respuesta inflamatoria post-trasplante (Iba1) ↑ Supervivencia y diferenciación de NPCs trasplantadas (DCX) ↑ Angiogénesis (CD31)	(Lam et al 2014, Moshayedi et al 2016)
MCAO rata	Quitosano – AKBA (1 hora)	↓ Necrosis y/o apoptosis del tejido infartado (TUNEL) ↓ Volumen de infarto (TTC) ↓ Déficits neurológicos (Sistema Longa de valoración (Longa et al 1989)) ↓ Inflamación (5-LOX; NF-κB) ↑ Moléculas antioxidantes (Nrf2; HO-1)	(Ding et al 2016)
MCAO rata	Gelatina – MSCs (1 semana)	↓ Volumen de infarto (secciones coronales sin tinción) ↓ Déficits motores (test de rotarod)	(Ito et al 2017)

CCAO: oclusión de la arteria carótida común; NSCs: células madre neurales; PGA: Ácido poliglicólico; PLGA: ácido poli láctico-co-glicólico; DIL: octadecil indocarbocianina; BDA: dextrano amino biotinilado; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; HE: hematoxilina/eosina; MRI: imágenes de resonancia magnética; NeuN: proteína nuclear neural; CD11b: marcador de microglía; RECA1: marcador de células endoteliales; Col IV: colágeno tipo IV; MET: microscopía electrónica de transmisión; NSS: escala de valoración neurológica modificada; ECM: matriz extracelular; iPS-NPCs: células madre y progenitores neurales inducidos; HA: ácido hialurónico; Iba1: molécula adaptadora de unión a calcio inoizado tipo 1 (microglia); DCX: doblecortina; CD31 marcador endotelial; AKBA: ácido Acetil-11-ceto- β -boswellico; 5-LOX:

En cuanto al uso de los hidrogeles en terapia neurorrestaurativa, cabe destacar que la reología de los mismos, es decir sus propiedades mecánicas tales como la rigidez/elasticidad, guardan una estrecha relación con el grado de compatibilidad del biomaterial ensayado ([Lam et al 2014](#), [Yang et al 2009a](#)). Lam y col., identificaron que cuando la rigidez del hidrogel de ácido hialurónico (HA) ensayado se acercaba a la del cerebro, la respuesta inflamatoria producida en el tejido huésped era de menor consideración, identificando inmunofenotípicamente un menor porcentaje de astrocitos (GFAP) y/o microglía activa (Iba1). Adicionalmente, identificaron cómo las células que fueron trasplantadas en el interior de los hidrogeles de HA, presentaron una mayor capacidad de diferenciación hacia neuroblastos (DCX⁺) a diferencia de cuando las iPS-NSCs fueron inyectadas en solución. Yu y col., trasplantaron NSCs integradas en hidrogeles de colágeno tipo I (Col I), e identificaron como las células trasplantadas adquirían propiedades de células neurales maduras, detectando una mayor presencia de células Tau⁺ y la formación de nuevas sinapsis identificadas mediante microscopía electrónica de transmisión, lo cual podría haber promovido, tal y como postulan en su trabajo, la recuperación funcional parcial observada en los animales trasplantados ([Yu et al 2010](#)).

Entre los beneficios observados en los distintos ensayos con células y materiales, se encuentran la reducción del volumen de infarto, la neuro-regeneración del tejido perdido, la neo-vascularización tisular en la zona infartada y sólo en algunos casos se muestra una mejora general de las funciones sensorimotoras tras el tratamiento, siendo estos beneficios derivados de un incremento en el tiempo de vida del injerto de células y/o la liberación continuada de factores de crecimiento mediada por la presencia del biomaterial. Sin embargo, es necesaria una profunda reflexión sobre la posible aplicabilidad clínica de los biomateriales sintéticos y/o naturales que se están empleando en los modelos actuales, ya que en muchos casos se desconoce el posible efecto adverso a corto y largo plazo derivado del implante. Por ejemplo, una limitación importante del uso de matrices basadas en ácido hialurónico (HA) deriva en que se ha demostrado que la acumulación patológica de HA cerebral está relacionada con procesos de envejecimiento asociados a la astrogliosis derivada de la edad y en enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple ([Back et al 2005](#), [Cargill et al 2012](#)). Estos estudios han identificado que el ácido hialurónico, impide la re-mielinización de la lesión, inhibiendo la maduración de los precursores oligodendrocíticos a células maduras productoras de mielina, lo cual se encuentra estrechamente relacionado con la aparición de este tipo de lesiones desmielinizantes ([Back et al 2005](#), [Sloane et al 2010](#)), además de provocar fuertes reacciones inmunológicas ([Ghuman et al 2016](#)). En cuanto al uso del colágeno en el escenario clínico, una limitación importante se encuentra relacionada con que su fuente de obtención es relativamente finita, y podría contaminarse con priones, agentes causantes de varios tipos de encefalopatías ([Locht et al 1986](#), [Luan et al 2006](#)), además de presentar un índice de degradación sustancial. Otros biomateriales ensayados como el quitosano, polisacárido natural derivado de la desacetilación del exoesqueleto de artrópodos ([Suh & Matthew 2000](#)), han sido empleado en reparación de lesiones corneales ([Tsai et al 2016](#)), de nervio

periférico ([Nawrotek et al 2016](#)), o en reparación cerebral ([Ding et al 2016](#), [Mo et al 2010](#)). Sin embargo, los biomateriales basados en quitosano presentan algunas desventajas tales como una rápida biodegradación *in situ* ([Boisserand et al 2016](#)), y sus productos de degradación en función del método de preparación del polisacárido, pueden originar reacciones alérgicas ([Tsai et al 2016](#)). Del mismo modo, los productos de degradación del PLGA incluyen derivados ácidos, que podrían exacerbar la respuesta inflamatoria a largo plazo ([Emerich et al 1999](#), [Nicholas et al 2002](#), [Skop et al 2014](#)).

La progresiva identificación de riesgos para la salud y el carácter adverso de algunos materiales ha llevado a la búsqueda intensiva de biomateriales alternativos, seguros, inertes y pobremente inmunogénicos como es el caso de la fibroína de la seda. La seda está constituida por fibras proteicas, cuya producción se lleva a cabo en glándulas específicas presentes en varias especies de artrópodos ([Craig 1997](#), [Yonemura et al 2009](#), [Yonemura et al 2012](#)). Artrópodos como las arañas y el gusano de seda, producen este material con distintos fines (reproducción, construcción de redes para atrapar a presas, protección), siendo en el gusano, la especie donde se produce en cantidades más elevadas, al emplearla en la construcción de los capullos donde las larvas sufren su metamorfosis a polillas ([Andersson et al 2016](#)). La seda natural, ha sido ampliamente utilizada lo largo de la historia en la fabricación de ropa o como material de sutura en heridas, y gracias al conocimiento de nuevas formas de procesamiento y modulación de sus propiedades mecánicas y de biodegradación está siendo empleada en nuevas aplicaciones biomédicas ([Omenetto & Kaplan 2010](#)). La seda se compone de cadenas poli-peptídicas de sericina y fibroína ([Inoue et al 2000](#)), siendo ésta última la que se presenta en mayor porcentaje dentro de la seda (70% en los capullos de la especie *Bombix mori*). La fibroína confiere las propiedades de resistencia a la tracción y flexibilidad de la seda, y su superficie presenta grupos carboxilo terminales sobre los que se pueden unir covalentemente motivos de adhesión como el triplete aminoacídico RGD encontrado en proteínas de matriz extracelular como la fibronectina ([Sofia et al 2001](#)), hormonas o factores de crecimiento ([Karageorgiou et al 2006](#), [Li et al 2006a](#)). Entre sus principales propiedades, su nula inmunogenicidad y su carácter como material inerte debido a la ausencia de grupos funcionales en su secuencia peptídica que impide su reconocimiento por el sistema inmune huésped ([Enomoto et al 2010](#), [Meinel et al 2005](#)), ha favorecido su excelente biocompatibilidad como material de soporte en la regeneración de distintos tejidos.

Su uso en combinación con MSCs, ha permitido la regeneración del hueso dañado, en un modelo de fractura ósea no cicatrizante en ratas inmuno-deficientes ([Meinel et al 2006](#)). Meinel y col. cultivaron MSCs sobre bloques de fibroína, en ausencia o presencia de medio condicionado para su diferenciación osteogénica y su posterior implante. Observaron, como la formación de hueso en los animales tratados con las MSC diferenciadas y los bloques de fibroína, consiguió una reparación ósea parcial, a diferencia de los animales tratados con las MSCs sin diferenciar solas o sobre los bloques de fibroína, o de los animales a los que solo se les implantó la fibroína sin las células. Por otro lado, empleando factores de crecimiento de condrocitos adheridos a la estructura

porosa de esponjas de fibroína ([Uebersax et al 2008](#)) y realizando cultivos en cámaras de agitación (biorreactor) ([Shangkai et al 2007](#)), se ha conseguido inducir la formación de cartilago. La fibroína de la seda también ha sido empleada en regeneración de ligamentos y/o tendones ([Altman et al 2002](#), [Cooper et al 2007](#), [Hairfield-Stein et al 2007](#)), parches cardíacos ([Yang et al 2009b](#)), membranas timpánicas ([Levin et al 2010](#)), o en la regeneración de tejido vascular ([Soffer et al 2008](#)), siendo prometedores los resultados obtenidos en el tratamiento de aneurismas, empleándolos como dispositivos auto-expandibles, permitiendo reconstruir el flujo sanguíneo laminar y la presión arterial ([Causin et al 2011](#)). Adicionalmente, la fibroína ha mostrado una elevada compatibilidad para el crecimiento de diferentes poblaciones celulares. Calabrese y Kaplan, demostraron como la integración de MSCs humanas en geles o cultivadas sobre láminas de fibroína, permite no sólo la supervivencia celular de los cultivos, sino también su diferenciación a adipocitos, condrocitos y osteoblastos en presencia de diferentes medios condicionados ([Calabrese & Kaplan 2012](#)). Sun y col. encapsularon células madre neurales (NSCs) en el interior de hidrogeles de fibroína modificados con IKVAV (secuencia peptídica que favorece el crecimiento axonal ([Tysseling-Mattiace et al 2008](#)), detectando una morfología más porosa y una estructura más rígida en estos últimos, que además favoreció el incremento de la viabilidad celular y potenció la capacidad de diferenciación neuronal ([Sun et al 2015b](#)). Tras una semana en cultivo, Sun y col., identificaron neuronas diferenciadas positivas para los marcadores nestina, β III-tubulin- y MAP-2. Esta población celular fue encontrada indistintamente en hidrogeles no modificados como en aquellos funcionalizados con la secuencia peptídica IKVAV, sugiriendo que este biomaterial puede tolerar el crecimiento y diferenciación de NSCs, avalando la relevancia de sus hallazgos en reparación cerebral. Otros estudios, han confirmado la compatibilidad de distintos formatos de fibroína de la seda (láminas, nanofibras) con diferentes poblaciones neurales, como por ejemplo, células de schwann ([Rao et al 2017](#), [Schuh et al 2016](#)), astrocitos ([Qu et al 2013](#)), neuronas ([Roloff et al 2014](#)); o con otros fenotipos celulares como fibroblastos ([Minoura et al 1995a](#)) y MSCs ([Luan et al 2006](#), [Tang-Schomer et al 2014a](#)).

Los estudios que han utilizado este biomaterial para el tratamiento de patologías del SNC son realmente escasos. Szybala y col. emplearon microesferas porosas de fibroína para la liberación controlada de adenosina en un modelo epiléptico en ratas ([Szybala et al 2009](#)), observando una degradación de las microesferas no dependiente de la activación de poblaciones inflamatorias. Recientemente, Cha y col., emplearon una fracción peptídica de la fibroína para trasplantarla en el cerebro intra-ventricularmente en un modelo de la enfermedad de alzheimer ([Cha et al 2017](#)). Sus estudios se basaron en que las cadenas de aminoácidos resultantes de la degradación enzimática de la fibroína poseen características anti-oxidantes ([Zhaorigetu et al 2003](#)), y en este caso incrementaron la expresión del neurotransmisor acetil-colina, mejorando la recuperación funcional de los animales, sin presentar respuestas inmunológicas de consideración ([Cha et al 2017](#)).

En resumen, los antecedentes presentados en el escenario preclínico y clínico actual esbozan una magnífica oportunidad para el tratamiento del ACV utilizando MSCs ([Bang et al 2005](#), [Lee et al](#)

[2010a](#), [Savitz et al 2005](#), [Steinberg et al 2016b](#), [Suarez-Monteagudo et al 2009](#)), si bien los mecanismos de recuperación asociados al trasplante de esta población celular no están completamente dilucidados. Por otro lado, la co-inyección de MSCs con diferentes biomateriales puede favorecer la viabilidad del injerto celular, estimulando mecanismos de neuroprotección y neuro-reparación logrando una mejor recuperación funcional de los animales tal y como ha sido atestiguado en múltiples estudios ([Chen et al 2010](#), [Jin et al 2010a](#), [Lam et al 2014](#), [Moshayedi et al 2016](#), [Osanai et al 2010](#), [Park et al 2002](#), [Yu et al 2010](#)).

Finalmente, la falta de suficientes evidencias preclínicas que avalen la tolerabilidad y seguridad de muchos de los biomateriales que están siendo empleados en terapia neurorestaurativa, así como la falta de información sobre los mecanismos de neuro-regeneración y/o plasticidad cerebral responsables de la evolución funcional post-tratamiento, predispone al ensayo de nuevos materiales y nuevos abordajes como el que se presenta en esta memoria.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El ictus, se presenta como la segunda causa de defunción prematura en el mundo, constituyendo la primera en causar discapacidad en el ser humano ([Hankey 2017](#)). En términos generales, seis meses después de un ictus un número considerable de pacientes (25-53 %) son sujetos dependientes para la realización de al menos una tarea cotidiana ([Carmichael 2016](#)). Para la mayoría de los pacientes no hay disponible actualmente terapias efectivas capaces de reparar el tejido cerebral dañado y promover un grado satisfactorio de recuperación funcional. La restauración de la función perdida tras un daño cerebral es un problema muy complejo de resolver, que demanda un entendimiento profundo de la conectividad anatómica y funcional entre distintas áreas del cerebro en condiciones fisiológicas y patológicas.

En los modelos preclínicos de daño cerebral afectando a la corteza sensorial y/o motora, no se conoce con demasiado detalle el sustrato molecular, celular y de conectividad anatómico/funcional entre distintas áreas cerebrales responsable de la recuperación sensorimotora en respuesta a un determinado tratamiento. Conceptualmente, la recuperación funcional podría estar relacionada con: i) fenómenos de reorganización cortical en regiones peri-infartadas del hemisferio afectado ([Brown et al 2009](#)) y en áreas distantes del hemisferio opuesto ([Dijkhuizen et al 2001](#)); ii) la regeneración del tejido cerebral y el reestablecimiento de la circuitería dañada ([Ramos-Cabrer et al 2010](#), [Taguchi et al 2004](#), [Wang et al 2016b](#)); iii) estrategias posturales compensatorias que son especialmente relevantes en infartos cerebrales con afectación del cortex motor ([Farr & Whishaw 2002](#), [Knieling et al 2009](#)). En cuanto al primer mecanismo, la reorganización cortical, no se ha podido definir si este fenómeno es maladaptativo y contribuye a incrementar los déficits sensorimotores tras el infarto ([Kim et al 2015](#)); o si por el contrario carece de toda relación ([Xerri et al 1998](#)) o más bien participa ([Andres et al 2011](#), [Castro-Alamancos & Borrel 1995](#), [Dijkhuizen et al 2001](#), [Gonzalez & Kolb 2003](#), [Nudo et al 1996b](#), [Shanina et al 2006](#)) en el patrón temporal de recuperación funcional, haciendo difícil establecer que paradigmas terapéuticos deberían ser usados para promover una plasticidad cortical dirigida.

Una estrategia prometedora para la mejoría funcional de los pacientes con ictus podría ser el trasplante de células madre y progenitores de origen mesenquimal (MSC/P). Los ensayos clínicos han demostrado que las MSC/P pueden ser trasplantadas por vía intravascular e intracerebral de forma eficaz y relativamente segura ([Banerjee et al 2014](#), [Hess et al 2017](#), [Kondziolka et al 2005](#), [Savitz et al 2005](#), [Suarez-Monteagudo et al 2009](#)). Sin embargo, no disponemos actualmente de un número razonable de ensayos aleatorizados y de pacientes tratados que puedan extender el uso de las MSC/P en la práctica médica ([Bang et al 2005](#), [Bliss et al 2010](#), [Hess et al 2017](#), [Prasad et al 2012](#), [Prasad et al 2014a](#), [Steinberg et al 2016b](#)). La liberación de factores neuroprotectores, neurotróficos e inmunomoduladores provenientes de las MSC/P, es responsable en parte, de la recuperación funcional observada en la mayoría de los modelos preclínicos ([Bao et al 2011](#), [Li & Chopp 2009](#), [Liu et al 2011](#), [Mora-Lee et al 2012](#), [Taguchi et al 2004](#)). Sin embargo, esta recuperación es generalmente modesta ([Wu et al 2015b](#)) y probablemente relacionada con la

reducida viabilidad y retención de las células implantadas en el tejido cerebral ([Bakshi et al 2005](#), [Bliss et al 2007](#), [Liu et al 2014b](#)).

El uso de distintos biomateriales para favorecer la regeneración cerebral se ha extendido progresivamente en los últimos años, debido entre otros factores, a su inherente capacidad para incrementar el tiempo de vida del injerto en la zona del implante ([Ballios et al 2015](#), [Hoban et al 2013](#), [Jendelova et al 2016](#), [Nih et al 2016](#)). Varios estudios han proporcionado ejemplos de cómo la integración de células y factores neurotróficos en materiales de distinto formato y composición resulta en una recuperación funcional del animal más eficaz que la simple inyección de las células terapéuticas ([Jendelova et al 2016](#), [Nih et al 2016](#), [Wang et al 2016b](#)). Entre los diversos tipos de biomateriales existentes, la fibroína de la seda destaca por ser un material inerte y de nula inmunogenecidad, además de haber sido utilizando desde hace años en distintas aplicaciones clínicas ([Altman et al 2003](#)). En varios estudios se ha demostrado la excelente compatibilidad de la seda con distintas estirpes celulares incluyendo las MSC/P o poblaciones celulares de origen neuronal y glial ([Calabrese & Kaplan 2012](#), [Hu et al 2016](#), [Xu et al 2016](#)). En relación al sistema nervioso central, se ha demostrado en modelos preclínicos que este biomaterial puede potenciar el efecto de fármacos anti-epilépticos ([Szybala et al 2009](#)) o reducir los déficits cognitivos en modelos de la enfermedad de Alzheimer ([Cha et al 2017](#)), haciendo de este material un excelente candidato como soporte al implante intra-cerebral de poblaciones celulares con actividad neuro-reparadora.

En base a estos antecedentes, en esta tesis se planteó la siguiente hipótesis de estudio: *La fibroína de la seda en un formato adecuado para implante intracerebral podría favorecer la viabilidad del injerto de MSC/P respecto al implante único de esta población celular, conduciendo a una liberación sostenida de factores neurotróficos y una mayor neuroprotección así como la estimulación de la actividad neurogénica, en un modelo de daño cerebral en el ratón. La recuperación funcional tras el daño cerebral podría producirse a través de la regeneración del tejido cerebral dañado ([Ramos-Cabrer et al 2010](#), [Wang et al 2016b](#)) y/o por mecanismos de plasticidad cerebral en áreas perilesionales ([Bao et al 2011](#), [Brown et al 2007](#), [Mohajerani et al 2013](#), [Nudo et al 1996b](#)).*

En base a esta hipótesis se establecieron los siguientes objetivos de estudio:

- **Objetivo 1: Desarrollo y caracterización de un formato de fibroína de la seda adecuado para implante intracerebral.**

Para el desarrollo de este objetivo primeramente se estudiaron las condiciones óptimas de gelificación en una ventana temporal adecuada para el implante intracerebral del biomaterial. Por un lado se examinó la respuesta inflamatoria y de muerte celular causada por la presencia del biomaterial en el tejido cerebral. Asimismo se abordó el estudio de la función cognitiva y sensorimotora de los animales implantados con el biomaterial mediante tests de comportamiento y registros electrofisiológicos (electroencefalograma, electromiograma y potenciales evocados somatosensoriales).

- **Objetivo 2: Evaluación de la compatibilidad biológica de la fibroína de la seda con células madre y progenitores de origen mesenquimal. Estudios de integración celular con el biomaterial.**

Se estudiaron varios mecanismos de interacción de esta población celular (MSC/P) con el biomaterial, analizando la supervivencia a corto y largo plazo, capacidad expansiva (proliferación), adhesión y multipotencia. Finalmente se explorará la capacidad del biomaterial para favorecer la supervivencia del injerto de MSC/P en el tejido cerebral.

- **Objetivo 3: Desarrollo y caracterización funcional de un modelo de daño cerebral en el ratón.**

Se desarrolló un modelo animal de infarto cerebral basado en la oclusión permanente a nivel distal de la arteria cerebral media (dMCAO). Se evaluó la extensión del territorio somatosensorial y motor afectado examinando la función sensorimotora mediante tests de comportamiento y la actividad cortical de ambos hemisferios cerebrales mediante el estudio de los potenciales de campo provocados.

- **Objetivo 4: Evaluación de la eficacia terapéutica asociada con el implante de células madre mesenquimales integradas en geles de fibroína.**

Se examinó la eficacia terapéutica del implante de las MSC/P integradas en el biomaterial respecto al implante único de MSC/P. Para ello se estudió la función sensorimotora y la actividad cortical en ambos hemisferios a lo largo de varias semanas tras el tratamiento.

Figura 2.1. Esquema que resume los objetivos de estudio propuestos en esta tesis.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Estudios “*in vitro*”.

3.1.1. Extracción de fibroína de la seda y obtención de los distintos formatos.

La extracción de la fibroína de la seda se realizó a partir de capullos de seda de la especie *Bombix mori*, generosamente proporcionados por el Profesor Jose Luis Cenis (Departamento de Biotecnología y Protección de Cultivos) del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario y el Profesor Gustavo Guinea del laboratorio de Biomateriales e Ingeniería Regenerativa (LBIR) del Centro de Tecnología Biomédica (CTB). Los procedimientos de extracción, obtención y caracterización estructural y mecánica de los distintos formatos de fibroína fueron realizados en este último laboratorio (LBIR). La extracción de la fibroína constó de 3 fases bien caracterizadas (**Figura 3.1.** ([Rockwood et al 2011](#))). (1) Fase de desgomado. Los capullos de seda fueron cortados en trozos pequeños y desgomados en una solución al 0.02 M de carbonato sódico (Na_2CO_3) en agua destilada. La solución se autoclavó (autoclave Sturdy SA-252F; Taipei, Taiwan) con un programa en líquido (121 °C, 103,4 kPa durante 30 min y 20 min de secado), un procedimiento que elimina la mayor parte del contenido de sericina, siendo su presencia indetectable por técnicas convencionales de electroforesis en geles de poliacrilamida ([Perea et al 2016](#)). (2) Fase de disolución. Las fibras de fibroína resultantes del desgomado se lavaron varias veces con agua destilada y se dejaron secar durante 12-16h. Una vez secas, las fibras se disolvieron en una solución acuosa de bromuro de litio 9.4 M durante al menos 4 horas a 60 °C en agitación continua, tal y como ha sido descrito con anterioridad ([Rockwood et al 2011](#)). (3) Fase de purificación. La solución final de fibroína en bromuro de litio fue dializada durante 48 horas en

Figura 3.1. Esquema de la extracción y liofilización de la fibroína a partir de capullos de seda (Modificado ([Rockwood et al 2011](#))). Se muestran las distintas fases del proceso de obtención y enriquecimiento de la fibroína a partir de los capullos del gusano de seda "*Bombix mori*". La fibroína liofilizada constituye el punto de partida para la obtención de los distintos formatos empleados en esta tesis; "*films*" e hidrogeles.

agua destilada, utilizando “cassettes” de diálisis (Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette G2 MWCO 3500, Pierce, Thermo scientific). El agua de diálisis se renovó repetidamente hasta que la conductividad de la misma alcanzó la del agua destilada. Una vez finalizada la diálisis se extrajo la solución de fibroína de los cassettes, y se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 20 min a 4 °C para retirar las impurezas de la muestra. (4) Fase de liofilización. El producto resultante tras la centrifugación (“pellet”) fue congelado a -80 °C y liofilizado (LyoQuest, Telstar) para obtener un sólido final de fibroína a partir del cual pudimos obtener los distintos formatos de biomaterial empleados a lo largo de esta tesis.

3.1.1.1. Obtención de “films” de fibroína.

Primeramente, la fibroína liofilizada se disolvió al 2, 4, 6 y 8% (p/v) en el solvente polar 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP, Sigma Aldrich; Cat# 105228). La disolución resultante se filtró en condiciones de esterilidad a través de un filtro de tamaño de poro de 0.2 µm (Sterile Syringe Filter 0,2µm polyetherulfone membrane, VWR) acoplado a una jeringuilla estéril (10ml Soft-ject®, Henke sass wolf). La solución filtrada (200 µl) se depositó en pocillos de placas “*multi-well*” (BioLite 24 Wll Multidish, Thermo Scientific) y cada placa se cubrió con una película plástica de parafina (“*parafilm*”) que se agujereó con una jeringuilla (21 AWG) para permitir la evaporación progresiva del disolvente durante 12-16h a Tª ambiente. Posteriormente, los “films” de fibroína depositados en los pocillos se insolubilizaron en soluciones seriadas de etanol en agua destilada (80% durante 60 min; 70%/30 min; 50%/10 min y finalmente 20%/10 min) para evitar su posible solubilización en los medios de cultivo celular que posteriormente se emplearon. En los ensayos de viabilidad, proliferación, adhesión y diferenciación, antes de sembrar las células sobre los “*films*”, éstos se lavaron repetidamente con agua destilada estéril.

3.1.1.2. Obtención de hidrogeles de fibroína.

La obtención de geles de fibroína se realizó mediante sonicación utilizando un sonicador Branson modelo 450 (Branson Ultrasonics Co., Danbury, Connecticut) acoplado a una punta de 3 mm de diámetro (Tapered Microtip). La sonicación se realizó en tubos de centrifuga cónicos de 15 ml (Corning™ Falcon™) utilizando soluciones de 6ml de fibroína al 1 y 2% (p/v) en tampón fosfato salino (PBS) sin calcio ni magnesio. Las soluciones se sometieron a uno o dos pulsos de sonicación de 30 s de duración, manteniendo siempre durante la sonicación los tubos en hielo. Cuando se aplicaron dos pulsos, el intervalo entre pulsos fue de 1 min, tiempo durante el cual las muestras se dejaron a Tª ambiente. La amplitud de los pulsos de sonicación fue de 20, 40 y 60%, definiéndose dicha amplitud como la distancia axial que recorrió la punta del sonicador en cada ciclo de sonicación. El rango de amplitud para la micropunta del equipo utilizado fue de 116-494 µm. Intensidades del 20% y del 60% se correspondieron con amplitudes de movimiento de 179 µm y 433.5 µm respectivamente. Para cada ensayo, dada la diferente viscosidad entre distintas muestras, el equipo entregó valores variables de potencia para mantener relativamente constante la amplitud de movimiento de la punta en el interior del fluido sonificado.

3.1.2. Estudio y caracterización de los hidrogeles de fibroína.

3.1.2.1. Monitorización del proceso de gelificación.

Para caracterizar el proceso de gelificación se examinaron los cambios en la turbidez de las soluciones de fibroína sonicadas mediante un espectrofotómetro de UV/Visible (ELX808, BioTek). La absorbancia está relacionada linealmente con la concentración del soluto según la Ley de Beer y Lambert, y en nuestro caso, la absorbancia a 550 nm a lo largo del tiempo, fue un indicativo de la turbidez de la muestra y por tanto del curso temporal de gelificación ([Matsumoto et al 2006](#)). La estructura secundaria de la fibroína presente en los hidrogeles (helices- α y láminas β) se caracterizó mediante técnicas de espectroscopia de infrarrojos con reflectancia total atenuada o IR-ATR mediante la transformada de Fourier (ATR-FTIR) ([Matsumoto et al 2006](#)). A distintos tiempos post-sonicación se congelaron volúmenes de 50 μ l de la solución de fibroína. Las muestras se liofilizaron y se analizaron en un espectrofotómetro ATR-FTIR (NicoletTM iSTM 5 FT-IR Thermo Scientific; con un módulo ATR acoplado). El espectro ATR-FTIR fue obtenido en el rango de 550 – 4000 cm^{-1} con 64 escáneres por espectro a una resolución de 4 cm^{-1} .

3.1.2.2. Caracterización microestructural de los hidrogeles de fibroína.

Veinticuatro horas después de la gelificación, los hidrogeles de fibroína se fijaron con glutaraldehído al 4% (p/v) en (PBS) durante 1 hora a T^a ambiente. Los hidrogeles se lavaron con PBS y se deshidrataron progresivamente sumergiendo las muestras dos veces (10 min cada vez), en soluciones crecientes de etanol en agua destilada (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100% v/v). Una vez deshidratados, los hidrogeles se secaron empleando un secador de punto crítico de CO₂ (Polaron, CPD Jumbo E-3100; Lewes, Reino Unido), donde el etanol se intercambia lentamente por CO₂, haciendo que la muestra se seque a la presión y T^a crítica del CO₂ (31.04°C; 72.85 atm). Posteriormente, las muestras fueron recubiertas con oro y una aleación de platino utilizando un equipo Emitech SC7620 (60s, 18 mA y presión de cámara de 0,2 mbar). Las diferentes muestras se examinaron mediante un microscopio electrónico de barrido FESEM Auriga Zeiss a 4 kV. Las imágenes fueron adquiridas y analizadas con el software SmartSEM V.5.05, Zeiss.

3.1.2.3. Caracterización mecánica de los hidrogeles de fibroína.

Los ensayos de compresión uniaxial se realizaron sobre hidrogeles de fibroína generados al 1 y 2 % (p/v) en PBS. Una vez las soluciones fueron sonicadas, éstas se vertieron sobre moldes cilíndricos de 10.4 mm de diámetro y se dejaron gelificar a T^a ambiente durante al menos 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, los cilindros de hidrogeles de fibroína se cortaron a una longitud de 10 mm, y se colocaron entre dos placas paralelas adaptadas a un equipo de instrumentación (**Figura 3.2.** Instron 4411). Los cilindros se centraron sobre el eje de carga de la máquina, y la fuerza aplicada sobre ellos se midió con una balanza electrónica (PLI Kern 3500)

colocada sobre la placa inferior de la misma. La velocidad de compresión se fijó en 1 mm/min mediante fuerzas (Kpa) de aplicación variable. Los ensayos de compresión se realizaron tanto en aire (24 °C y 45% de humedad relativa) como sumergiendo los cilindros de hidrogel en PBS (24°C y 100% de humedad relativa). El área de la sección transversal del cilindro de hidrogel se utilizó para calcular las curvas de tensión/deformación(ϵ) y de rigidez/resistencia a tracción. Donde la tensión (σ) se define como $\sigma = F / A_0$, siendo F la fuerza instantánea y A_0 el área de la sección transversal del cilindro inicial. La deformación (ϵ) se define como $\epsilon = \Delta H / H_0$, siendo ΔH la longitud de la muestra tras la deformación y H_0 la longitud inicial del cilindro.

Figura 3.2. Aparato de instrumentación Instron 4411. En la imagen se muestra como el cilindro de hidrogel se dispone entre dos placas paralelas que producen la progresiva, compresión del biomaterial a la velocidad elegida (1mm/min). El equipo permitió controlar la velocidad de deformación del hidrogel, independientemente de la resistencia ofrecida por el mismo, y gracias a la balanza situada debajo de la placa inferior, se obtuvieron los valores de la fuerza (kPa) aplicada para conseguir la deformación en el tiempo requerido. El hidrogel fue progresivamente deformándose a la velocidad fijada, hasta que se rompió (punto de rotura), y las curvas que relacionan la fuerza aplicada y la deformación del biomaterial nos permitieron calcular el módulo elástico, la tensión a la rotura.

3.1.3. Expansión clonal de MSC/P.

Para el desarrollo de los objetivos 2 y 4 de esta tesis se utilizaron cultivos primarios enriquecidos en células madre y progenitores mesenquimales (MSC/P) derivadas de la médula ósea de dos cepas distintas de ratones nativos silvestres (WT), cepas C57/BL6 y CD-1. También se utilizaron MSC/P procedentes de ratones modificados genéticamente (C57/BL6-Tg-CAG-EGFP) que expresaron la proteína fluorescente verde como gen reportero. La obtención, aislamiento y enriquecimiento de las MSC/P fue realizado tal y como ha sido descrito previamente ([Gonzalez-Nieto et al 2012](#)). Primeramente, los animales se sacrificaron en atmosfera de CO₂, seguida de dislocación cervical. La extracción de los huesos planos (pelvis) y largos (fémur y tibia) se realizó en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar (Labgard class II Biological safety cabinet, ES). Los huesos se trituraron en un mortero de porcelana, en presencia de PBS frío a 4°C (Gibco® life technologies). El contenido celular tras la trituración, fue filtrado (“cell strainer” 40 μ m,

BD bioscience) y centrifugado a 1.500 r.p.m. durante 5 min a 4°C (Hettich, Rotina 380.R; Cat# D-78532 Tittlingen). El sobrenadante se descartó y el “*pellet*” resultante fue resuspendido durante 1-3 min a Tª ambiente en 10 ml de solución de lisis (BD Pharm Lyse™) para eliminar los glóbulos rojos, realizándose una nueva centrifugación a 1.500 r.p.m. durante 5 min a 4°C. El nuevo “*pellet*” fue resuspendido en 4 ml de medio de cultivo IMDM (Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium; gibco® life technologies) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS; HyClone thermo scientific; Cat# SV30160.03) y la resuspensión celular fue nuevamente filtrada (tamaño de poro de 40 µm). Tras éste último filtrado, las células fueron sembradas a una concentración de $6.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ en frascos de cultivo ventilados (BioLite 75 cm2 Flask Vented, Thermo scientific), previamente tratados con fibronectina (Sigma aldrich; Cat# F4759) a una concentración de $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, durante 3 horas a 37°C. El crecimiento (expansión) celular se realizó en medio de cultivo IMDM suplementando con 20% de suero mesenquimal (Mesenquimal Stem Cell Stimulatory Supplements Mouse; STEMCELL™ technologies), 1% de penicilina/streptomina (1×10^5 unidades/ml de Penicilina y $1 \times 10^5 \mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina; gibco® life technologies), $100 \mu\text{M}$ de 2-β-mercaptoetanol (Fisher Scientific), 2mM de L-Glutamina (Gln, gibco® life technologies), 10ng/ml de hPDGF-BB (Peprotech®; Cat# 100-14B) y 10ng/ml de rmEGF (Peprotech®; Cat# 315-09). Al cabo de 72 horas de incubación (37°C, 5% CO₂, 95% aire y 100% humedad), el 50% del medio de cultivo se reemplazó por medio de expansión fresco. La hemi-depleción del medio de cultivo se realizó semanalmente y su finalidad fue eliminar progresivamente las células no adherentes (principalmente hematopoyéticas) así como utilizar un medio enriquecido en factores tróficos secretados por las MSC/P que favorecieran su propia expansión celular. Una vez establecidos los primeros pases de cultivo, el mantenimiento regular de las MSC/P fue realizado en medio completo, consistente en IMDM suplementando con 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomina (P/E) y 2mM de L-Glutamina. Para los ensayos realizados *in vitro* e *in vivo* se utilizó un número de pases en el rango de 5 a 10.

3.1.4. Separación magnética negativa de MSC/P.

La inmuno-separación magnética (“*sorting*” magnético) negativa fue realizada con un separador de tipo manual (MACS; Miltenyi Biotec; ES) utilizando los marcadores CD45 (linaje hematopoyético), CD31 (linaje endotelial) y Ter119 (linaje eritroide). Aproximadamente 3×10^6 células procedentes de médula ósea fresca fueron incubadas con 5 µl de anticuerpos anti-CD45 conjugado con APC (LCA, Ly-5 T200; BD; Cat# 559864), anti-CD31-APC (MEC 13.3; BD; Cat# 551262) y anti-Ter119-APC (Ly-76; BD; Cat# 17-5921). Como control negativo se utilizó un anticuerpo ISO-APC (APC Rat Ig2a isotype; BD; Cat# 553932). La incubación con los distintos anticuerpos se realizó durante 20 min a 8°C en solución de PBS, conteniendo 5 % de suero de ratón para minimizar la unión inespecífica de los anticuerpos. Tras la incubación, las células se lavaron con 3 ml de PBS y los tubos se centrifugaron a 1.500 r.p.m durante 5 min. Seguidamente se realizó la incubación con un anticuerpo secundario anti-APC conjugado con micropartículas magnéticas (MACS; Miltenyi

Biotec; Cat# 130-090-855), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Esta técnica de purificación permitió demostrar (ver resultados objetivo 2) la capacidad multi-potente de las MSC/P aisladas directamente de la médula ósea (sin expansión previa *ex_vivo*).

3.1.5. Caracterización inmunofenotípica de MSC/P.

La caracterización de las MSC/P de médula ósea se realizó mediante identificación negativa utilizando los anticuerpos primarios comentados en la sección previa (anti-CD45, anti-CD31 y anti-Ter119). Aproximadamente 3×10^6 células procedentes de MSC/P expandidas *ex_vivo* (ver sección 3.1.3.) fueron incubadas con 5 μ l de anticuerpos anteriormente mencionados (CD45-APC, CD31-APC, Ter119-APC e ISO-APC), en las condiciones que se indican en la sección anterior. Tras la centrifugación, el *“pellet”* resultante se resuspendió en 150-200 μ l de solución de fijación conteniendo 4 % de para-formaldehído (PFA) en PBS. Tras la fijación (15 min a Tª ambiente), las células se lavaron con 3 ml de PBS y fueron nuevamente centrifugadas. El *“pellet”* de células se resuspendió en 300-500 μ l de PBS y las células se filtraron por un tamaño de poro de 40 μ m para eliminar las agregaciones multi-celulares. La citometría de flujo se realizó en el servicio de Inmunología Celular del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, en un citómetro FASCanto II (Becton Dickinson and Company). La adquisición de eventos (1.000-2.000 por segundo) se realizó usando el software BD FACSDIVA™ V8.0.1 en el canal del APC (emisión: 660/20 nm) utilizando un láser rojo (excitación a 633nm). La identificación de las distintas poblaciones celulares, el porcentaje de fluorescencia y la intensidad media fluorescente fueron analizados empleando el paquete de software FlowJo (FlowJo® v10.2, LLC, Ashland, Oregón).

3.1.6. Caracterización de MSC/P procedentes de ratones C57/BL6-Tg (CAG-EGFP).

Las MSC/P procedentes de cultivos expandidos *ex_vivo* a partir de la médula ósea de ratones C57/BL6-Tg-CAG-EGFP fueron fijadas durante 15 min empleando un 4 % de PFA en PBS, a Tª ambiente. Tras la fijación, las células se lavaron con 3 ml de PBS y fueron centrifugadas a 1.500 r.p.m durante 5 min. El *“pellet”* de células se resuspendió en 300-500 μ l de PBS y las células se filtraron por un tamaño de poro de 40 μ m. La identificación, en función del número de pases, del porcentaje de células EGFP positivas así como la intensidad media fluorescente fue realizada mediante un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson and Company; Nueva Jersey, USA) utilizando un láser de excitación y un rango de emisión (canal FL1) próximo a la proteína EGFP (excitación:488nm; emisión 530nm). El software de adquisición utilizado fue OS 9.2.2, CellQuest Pro 4.0.2 y el análisis de los eventos fue realizado con el paquete FlowJo (FlowJo® v10.2, LLC, Ashland, Oregón).

3.1.7. Capacidad multipotente y diferenciación de MSC/P.

La capacidad multi-potente de las MSC/P fue estudiada (i) en médula ósea fresca; (ii) en MSC/P expandidas *ex_vivo*; y en (iii) MSC/P purificadas a partir de médula ósea fresca mediante separación magnética. Para examinar la formación de unidades formadores de colonias de fibroblastos (CFU-F) se sembraron 5×10^5 células por placa de cultivo de 35 mm (BioLite, Thermo Scientific). También se sembraron aproximadamente $0.5-2 \times 10^6$ células/placa para estudiar la diferenciación de las MSC/P a osteoblastos (CFU-Ob), adipocitos (CFU-Ad) y condrocitos (CFU-Cd). Las células se sembraron a la concentración requerida en un volumen final de 1 ml en cada placa de cultivo, realizándose la incubación celular a 37°C, 5% CO₂, 95% aire y 100% humedad. La composición de los distintos medios condicionados y el análisis de los distintos fenotipos celulares se detallan a continuación: **CFU-F**: medio de cultivo IMDM, 30% suero mesenquimal (Mesenquimal Stem Cell Stimulatory Supplements Mouse; STEMCELL™ technologies), 1% de P/E, 2mM de L-Glutamina, 10ng/ml de hPDGF-BB (Peprotech®; Cat# 100-14B) y 10ng/ml de rmEGF (Peprotech®; Cat# 315-09). Además, en la médula ósea fresca se utilizó 40% de metilcelulosa (Methocult®M3134, Stem Cell Technologies Inc) tal y como ha sido previamente descrito ([Gonzalez-Nieto et al 2012](#)). **CFU-Ob**: medio de cultivo IMDM, 30% suero mesenquimal, 1% de P/E, 2mM de L-Glutamina, 0,1µM Dexametasona (FisherScientific), 100µM 2-Mercaptoetanol (β-mercaptoetanol; FisherScientific), 0,25mM ácido ascórbico (Sigma Aldrich; A5960), 10mM 2-Glicerol-fosfato (Sigma Aldrich; G6501), además de 40% de metilcelulosa cuando se utilizó médula ósea fresca. **CFU-Ad**: medio de cultivo IMDM, 20% suero mesenquimal, 1% de P/E, 2mM de L-Glutamina, 0,1µM Dexametasona, 100µM 2-Mercaptoetanol, 100µM Indometacina (Sigma Aldrich; I7378), 5µg/ml insulina (Sigma Aldrich; I9278), y en médula ósea fresca 40% de metilcelulosa. **CFU-Cd**: medio de cultivo IMDM, 20% suero mesenquimal, 1% de P/E, 2mM de L-Glutamina, 0,1µM Dexametasona, 100µM 2-Mercaptoetanol, 10ng/ml TGF-β1 (Peprotech®; Cat# 100-21), y 40 % de metilcelulosa en médula ósea fresca.

La identificación de las distintas colonias de fibroblastos, osteoblastos, adipocitos y condrocitos se realizó al cabo de 10-20 días en el caso de las CFU-F y de 40-50 días para el resto de grupos, tal y como se detalla a continuación: **CFU-F** (*Diff-Quik*® Staining Set; MICROPTIC; Cat# DQ-ST): la fijación de las colonias se realizó empleando metanol, y tras 15 min de incubación las placas se lavaron con H₂O destilada. Posteriormente las células fueron incubadas en eosina (30seg), lavadas con H₂O destilada e incubadas en azul de metileno (30seg) y nuevamente lavadas en H₂O destilada. **CFU-Ob** (kit fosfatasa alcalina; Sigma Aldrich; Cat# 86R): la fijación de las colonias se realizó empleando PFA al 4% en PBS, y tras 15 min de incubación las placas se lavaron con H₂O destilada. Posteriormente y siguiendo las instrucciones de la casa comercial, las placas se incubaron 15 min a T^a ambiente con las soluciones contenidas en el kit; nitrito sódico, FRV alcalina y NAFTOL AS-BI (proporción 1:1:1), A continuación se lavó 2 veces con H₂O destilada y se incubó 2 min a T^a ambiente con una solución de citrato contenida en el kit. Posteriormente se añadió hematoxilina durante 30 s, lavándose a continuación con agua del grifo. **CFU-Ad** (Oil Red; Acros

organics; Cat# 189004250): la fijación se realizó empleando PFA al 4% durante 15 min a T^a ambiente y a continuación las células fijadas se incubaron con el reactivo “aceite rojo” (1% p/v, en una parte de alcohol isopropílico con 2 partes de H₂O destilada) durante 10-20 min a T^a ambiente. Después se retiró el colorante y se lavó con etanol al 70%, y dos veces con H₂O destilada. El colorante de contraste, hematoxilina, se añadió durante 1 minuto a T^a ambiente, lavándose varias veces el exceso de tinción con H₂O destilada. **CFU-Cd** (Azul toluidina; Sigma Aldrich; Cat# T3260): la fijación se realizó empleando PFA al 4% durante 15 minutos a T^a ambiente. Tras la fijación, las muestras se lavaron 3 veces con PBS y se añadió azul de toluidina al 1% en agua (p/v) durante 30 minutos a T^a ambiente. Las muestras se lavaron en HCl 1M durante 3-10 min a T^a ambiente para retirar el exceso de tinción inespecífica, y finalmente se lavaron con PBS.

3.1.8. Estudios “*in vitro*” de interacción entre MSC/P y fibroína.

3.1.8.1. Viabilidad, proliferación y ciclo celular de MSC/P en contacto con “films” de fibroína.

Los estudios de proliferación celular se realizaron sobre placas “*multi-well*” de 24 pocillos (BioLite, Thermo Scientific) utilizando MSC/P expandidas *ex vivo*. Aproximadamente 5×10^3 MSC/P se sembraron sobre plástico o “*films*” de fibroína. La estimación del número total de células por pocillo se realizó diariamente a partir del tercer día de cultivo. Para ello se retiró el medio de cultivo, se realizaron 2 lavados con PBS y de forma general las células se desprendieron del pocillo tras su incubación con 100-200 μ l de tripsina (tripsina-EDTA 0.5%; gibco® life technologies) durante 5 minutos a 37°C. La tripsina se inactivó añadiendo al pocillo 10-20 μ l de FBS y el contenido total del pocillo se transfirió a un tubo “*ependorf*”. El recuento celular se realizó en una cámara de Neubauer.

Para los ensayos de ciclo celular se utilizaron placas “*multi-well*” de 6 pocillos (BioLite, Thermo Scientific). Inicialmente se sembraron 20×10^3 células/pocillo (plástico o “film” de fibroína). Tras 24 horas de incubación en medio completo, éste fue retirado y las células fueron mantenidas durante 72 horas en IMDM con 1% de P/E en ausencia de suero (“*serum starvation*”) para sincronizar la actividad celular (G_0/G_1) de todo el cultivo. Tras este tiempo, el medio sin suero se reemplazó por medio completo. A distintos tiempos post-sincronización, las células fueron despegadas con 100-200 μ l de tripsina tal y como se describió anteriormente. Una vez recolectadas, las células se centrifugaron en tubos de citometría a 1.500 r.p.m. durante 5 min a 4°C y el “*pellet*” de células fue resuspendido en etanol (200 μ l) al 70% durante 1 hora en hielo. Tras la fijación, las células se lavaron con 3ml de PBS y se centrifugaron a 1.500 r.p.m. durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el “*pellet*” de células se incubó con 5 μ g de ribonucleasa (100 μ g/ml) (Ribonucleasa A Solution; Sigma Aldrich; Cat# R4642) durante 15 minutos a 37°C, tiempo tras lo cual, se añadió 200 μ l de 7-actinomicina D (7-ADD; lifeTechnologies; Cat# A1310) a una concentración de 2 μ g/ml, incubándose las células con este fluorocromo durante 20 min a T^a ambiente. Finalmente, las

células se lavaron añadiendo 4ml de PBS y se centrifugaron a 1.500 r.p.m. durante 5 min. Tras esta centrifugación, se realizó una nueva fijación de las células añadiendo 200 µl de PFA al 4% durante 15 min a Tª ambiente. De nuevo, las células se lavaron con 2ml de PBS y se centrifugaron a 1.500 r.p.m. durante 5 min. El “*pellet*” se resuspendió en 200-400 µl de PBS y se filtró a través de un “*cell strainer*” de 100 µm para eliminar las agregaciones multi-celulares. La adquisición de eventos se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company) utilizando un láser de excitación y un rango de emisión (canal FL2) próximo a la 7-ADD (excitación: 488nm; emisión: 585nm). El software de adquisición utilizado fue OS 9.2.2, CellQuest Pro 4.0.2. El análisis de los eventos fue realizado con el paquete FlowJo (FlowJo® v10.2, LLC, Ashland, Oregón).

La viabilidad celular a corto y largo plazo de las MSC/P sobre plástico o sobre “*films*” de fibroína se estudió en placas multi-well de 24 pocillos, comenzando con 20×10^3 células/pocillo (confluencia del 50-60%). Tras 48 horas de cultivo en medio completo, las MSC/P fueron incubadas con 0.1µg/ml de mitomicina C (Sigma Aldrich; Cat# M0503) durante 12 horas a 37°C para inducir una quiescencia prolongada. Tras este tiempo, se retiró la mitomicina C y las células fueron mantenidas en medio completo. El recuento celular se realizó semanalmente en una cámara de Neubauer. Asimismo, en cada punto temporal de análisis, las células fueron centrifugadas a 1.500 r.p.m. durante 5 min y el “*pellet*” resultante fue resuspendido en 200 µl de Ioduro de propidio a una concentración de 50 µg/ml (Sigma Aldrich; Cat# P4170) durante 20 minutos a 37°C. Tras esta incubación, las células se lavaron con 4ml de PBS y se centrifugaron a 1.500 r.p.m. durante 5 min. El “*pellet*” fue resuspendido en 200-300 µl de PBS y filtrado a través de un “*cell strainer*” de 100 µm. Los eventos fueron adquiridos en un BD FACSCalibur en el canal del FL2 (rango de emisión próximo a 585) utilizando un láser de excitación a 488nm. La adquisición y el análisis de los eventos fueron realizados utilizando el software descrito en el párrafo anterior.

3.1.8.2. Curso temporal e intensidad de adherencia de las MSC/P sobre “films” de fibroína.

El curso temporal de adhesión de las MSC/P a los distintos biomateriales incluyendo los “films” de fibroína se realizó sobre placas “*multi-well*” de 24 pocillos. La superficie de cada pocillo fue recubierta con los distintos biomateriales en diversas proporciones en función del material utilizado. En el caso de la laminina (Sigma Aldrich; Cat# L2020), la proporción fue de 4,25 µg/cm² diluida en 300µl de IMDM por pocillo e incubada durante 2 horas a 37°C, tiempo a partir del cual se aspiró el contenido del pocillo y se lavó abundantemente con PBS. Para la fibronectina (Sigma Aldrich; Cat# F4759), la proporción fue de 4 µg/cm² diluida en 300µl de PBS por pocillo e incubada durante 3 horas a 37°C. Aproximadamente 100 µl de fibroína al 6% p/v fueron utilizados en los ensayos de adhesión. En este caso los “films” fueron preparados en la forma descrita con anterioridad (sección 3.1.1.1.). Aproximadamente 20×10^3 células se sembraron por cada tipo de pocillo/biomaterial y el número de células adheridas se determinó a lo largo del tiempo post-

siembra, en nuestro caso, 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas (ver sección resultados, objetivo 2). Para ello, en cada punto temporal de análisis, primeramente se retiró el medio de cultivo del pocillo y a continuación las células se despegaron realizándose el recuento celular. En estos estudios se consideró que la adhesión celular fue máxima (100 %) cuando el número de células adheridas en un determinado punto temporal (“output”) fue equivalente al número de células inicialmente sembradas en cada pocillo (“input”).

Para los estudios de intensidad de adhesión célula-biomaterial, se emplearon cubreobjetos circulares de vidrio de 1.2mm de diámetro, que fueron recubiertos con los materiales anteriormente descritos. En el caso concreto de la fibroína, se realizó un recubrimiento previo del cubreobjetos con poly-L-lysina a una proporción de $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($3 \mu\text{g}/\text{pocillo}$; Sigma Aldrich; Cat# A-005-M) durante 1 hora a 37°C . Tras esta incubación se lavó abundantemente con PBS. Una vez secos, los cubreobjetos recubiertos de poly-L-lysina se incubaron con fibroína al 6% p/v tal y como se indicó anteriormente. La fibronectina y la laminina se añadieron a los cubreobjetos de vidrio en la forma y proporciones descritas previamente. Los cubreobjetos de vidrio recubiertos con los distintos biomateriales se introdujeron en placas “multi-well” de 24 pocillos. Aproximadamente 20×10^3 MSC/P se sembraron por pocillo en medio IMDM completo. Tras 48 horas post-siembra, los cubreobjetos conteniendo las células adheridas se retiraron con cuidado de cada pocillo y se colocaron de forma invertida sobre tubos de micro-centrifuga (tipo “*ependorff*”) de 1.5ml rellenos de PBS hasta su máxima capacidad. La fijación y estanqueidad de los cubreobjetos a los tubos de micro-centrífuga fue garantizada mediante la utilización de una película de parafina tipo “parafilm”. Los tubos “*ependorff*” fueron sometidos a fuerzas de centrifugación crecientes (1, 2, 8, 50 y 233 r.f.c.) durante 5 min, tiempo tras el cual los cubreobjetos se examinaron en transmitancia mediante un microscopio invertido (modelo Leica DMI3000, Nussloch, Alemania). El recuento (cámara de Neubauer) de las MSC/P que permanecieron adheridas a los distintos cubreobjetos tras la centrifugación (“output”) se realizó despegando las células en presencia de tripsina y posterior inactivación con FBS. Para estimar el porcentaje de células adheridas a los distintos biomateriales, se realizó el recuento de MSC/P adheridas a cubreobjetos (que no fueron sometidos a centrifugación, $n=3$) recubiertos con los distintos biomateriales tras 48 horas en cultivo (“input”).

3.1.8.3. Estudios de viabilidad y proliferación de MSC/P integradas en hidrogeles de fibroína.

La viabilidad, proliferación, retención y distribución de MSC/P en el interior de los hidrogeles se determinó tras la encapsulación de un número conocido de células (1×10^5) en soluciones de fibroína sonicadas ($500 \mu\text{l}$) en un estado de pre-gel (<10 min). Tras homogenizar la muestra celular en el hidrogel ([Ma et al 2014](#)), ésta se sembró sobre placas multi-well de 24 pocillos. Una vez producida la gelificación en el pocillo (aproximadamente en 10-15 min), se añadió medio de cultivo completo (IMDM; 10% FBS; 1% P/E; 1% Gln), el cual fue remplazado de forma regular. A distintos

tiempos post-encapsulación (72 horas, 1 y 2 semanas), se añadió a los pocillos 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de calceína-AM (CaAM viability Dye; eBioscience; Cat# 65-0853) durante 30 min a 37°C. En estos ensayos, las células viables emitieron fluorescencia asociada a la calceína con un pico máximo a 520 nm. La identificación de las células calceína positivas fue realizada empleando un microscopio de fluorescencia (Leica DMI3000, Nussloch, Alemania).

La distribución celular en el interior de los hidrogeles fue estudiada en dos puntos discretos post-encapsulación (2 y 4 semanas). En estos estudios, se mezclaron inicialmente 1.5×10^5 células en 500 μl de fibroína sonicada en estado de pre-gel que fueron añadidas sobre placas “multi-well” de 24 pocillos. Una vez producida la gelificación, se empleó un sacabocados de 5mm de diámetro que sirvió para obtener un molde cilíndrico (dimensiones del molde cilíndrico: 9 mm de altura x 5 mm de diámetro, $\sim 176 \text{ mm}^3$ de volumen total) con las MSC/P integradas. Los moldes cilíndricos fueron cultivados en nuevos pocillos de placas “multi-well” con medio completo, que fue reemplazándose de forma regular. En los puntos temporales de análisis, los cilindros de fibroína fueron incubados con CaAM tal y como se detalló anteriormente. La distribución celular fue examinada a lo largo de la longitud de cada cilindro. Para ello, se obtuvieron 3 cortes longitudinales de cada hidrogel empleando un cubreobjetos de vidrio de forma rectangular. Las secciones resultantes fueron colocadas en un portaobjetos, y las imágenes fueron adquiridas de forma secuencial (seriada) con un microscopio de fluorescencia (Leica DMI3000, Nussloch, Alemania) respetando la orientación del corte. Se cuantificó el número total de células en 12 campos o imágenes adquiridas (1 mm ancho x 0.75mm largo) distribuidos a lo largo de cada sección longitudinal cortada del hidrogel. Dado que el grosor de cada sección longitudinal analizada fue de 400 μm , el número de células cuantificadas por imagen correspondía a una unidad de volumen de campo (0.3 mm^3 ; 1 mm ancho X 0.75 mm largo X 0.4 mm de grosor). Posteriormente, siendo la longitud total del cilindro de 9 mm, y el diámetro del mismo de 5 mm, se calculó el contenido celular para cada una de las 12 rodajas analizadas (dimensiones: 0.75 mm de altura x 5 mm de diámetro, $\sim 14 \text{ mm}^3$ de volumen/rodaja), correspondientes a las 12 imágenes seriadas.

La proliferación celular en el interior de los hidrogeles se realizó empleando un kit de proliferación celular basado en el reactivo XTT (sal disódica 2,3-Bis-(2-Metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida), ([Scudiero et al 1988](#)). Aproximadamente 1.5×10^4 y 3×10^4 MSC/P fueron mezcladas con un volumen de 50 μl de fibroína sonicada y sembradas en placas “multi-well” de 96 pocillos (BioLite, Thermo Scientific) sobre las que se añadieron otros 50 μl de medio completo. La determinación relativa del contenido celular se realizó a distintos puntos temporales, retirando el medio de cultivo completo, e incubando con un volumen equivalente (50 μl) de XTT durante 4h a 37°C. Tras la incubación, éste nuevo medio fue retirado y medido en un lector de absorbancia para placas (biotek Elx800) a una longitud de onda de 450nm, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2. Estudios “*in vivo*”.

3.2.1. Animales.

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron ratones macho adultos de 8 a 12 semanas de edad de 4 cepas distintas: a) C57BL/6J (20-28 g de peso corporal); b) C57/BL6-Tg (CAG-EGFP) (20-28 g); c) B6SJL-Tg (5XFAD) (20-28 g) y d) CD-1 (37-40 g). Los animales fueron criados y alojados en el animalario del Centro de Tecnología Biomédica (con número de registro de la Comunidad de Madrid: ES280790002070), con acceso libre a comida y agua, en salas con temperatura, humedad y ciclo luz/oscuridad controlados. Las rutinas de comportamiento, se realizaron de 8.00 am a 5.00 pm por personal autorizado. Todos los procedimientos se realizaron en base a la normativa española para experimentación animal y utilización confinada de animales modificados genéticamente (Real Decreto 53/2013 y 178/2004; y Orden ECC / 566/2015) y de acuerdo a las directrices y código de buenas prácticas ARRIVE (“*Arrive Research: Reporting in Vivo Experiments*”).

3.2.2. Procedimientos quirúrgicos.

3.2.2.1. Trasplante intraestriatal de MSC/P y soluciones de fibroína.

Antes de comenzar el procedimiento, los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con una dosis de ketamina (100 mg/kg) y xilacina (10 mg/Kg) disueltas en PBS. La monitorización de la profundidad anestésica se realizó evaluando la actividad refleja podal y de pellizco de la cola. Una vez confirmada la ausencia de actividad refleja, los animales se colocaron en un equipo estereotáxico (David Kopf Instruments, California, USA) y se protegió sus ojos con vaselina, manteniendo su temperatura corporal a 37 °C durante y después de la cirugía, hasta que los animales se recuperaron totalmente de la anestesia. En condiciones asépticas, se realizó una incisión en el cuero cabelludo para exponer el cráneo, y en él se identificaron las suturas sagital y frontoparietal, que confluyen en el punto de referencia anatómica “Bregma” ([Paxinos & Franklin 2004](#)). La inyección de las distintas soluciones (fibroína, MSC/P, MSC/P integradas en hidrogeles o PBS) se realizó en el estriado dorsal (núcleos caudado-putamen) con las siguientes coordenadas de inyección: AP (eje antero-posterior):-1mm, L (lateral):+2,7mm y DV (eje dorso-ventral):+2,3 mm. Previamente a la inyección, se realizó en la región correspondiente a estas coordenadas un trepano en el cráneo mediante un microtaladro acoplado a una broca de 0.8 mm de diámetro (DREMEL® 8000). Para la inyección estereotáxica se empleó una jeringuilla Hamilton (modelo 701SN; Gauge 31s; pst3; Teknokroma®), cuyo extremo final (punta) permaneció al menos 3 minutos en el estriado antes de proceder a la inyección de las distintas soluciones. La infusión de las soluciones se realizó a una velocidad de 1µl/min hasta completar un volumen final de 5 µl. Una vez inyectado todo el volumen de solución, la punta de la aguja permaneció inmóvil

durante 3 min adicionales para favorecer la dispersión de la solución hacia el tejido estriatal y evitar su posible re-absorción hacia el interior de la aguja.

3.2.2.2. Modelo animal de infarto cerebral.

El modelo de isquemia cerebral focal empleado en esta tesis fue originalmente descrito en la rata ([Chen et al 1986](#)) y en nuestro caso se obtuvo por la oclusión directa mediante ligadura de la arteria cerebral media (MCA) a nivel distal respecto al polígono de Willis (**Figura 3.3.**). Durante la cirugía los ratones se anestesiaron con Isoflorano (1.5-2 % en aire). Los ojos de los animales se protegieron con vaselina y la temperatura corporal se mantuvo a 37 °C. Primeramente se realizó una pequeña incisión en la piel (0.5 cm) en condiciones de asepsia, entre el ojo y el oído derecho (arco cigomático) bajo un microscopio de disección (Amscope, California, EE.UU). Se retiró el músculo temporal, y se expuso lateralmente el cráneo derecho de los animales. En el hueso temporal se realizó un pequeño trepano (0,8 mm de diámetro) usando un microtaladro, y se fue retirando con unas pinzas de disección y de forma cuidadosa, pequeñas porciones de hueso temporal hasta que la MCA fue identificada. La arteria fue ligada distalmente respecto el polígono de Willis (por encima de las arterias perforantes o ramas lenticuloestriadas) utilizando un hilo de sutura de nylon de 9/0 (Lab Aragón; Cat# 20236), confirmando el momento de la oclusión por la pérdida de coloración achacable a la interrupción del flujo sanguíneo en la arteria ocluida. Finalmente, el musculo temporal se reubicó en su posición, y la piel se cerró empleando hilo de sutura de seda de 3/0 (Proclinic; Cat# 49994). Los animales recibieron una inyección subcutánea de 500 µl de solución salina para prevenir la deshidratación post-operatoria y fueron devueltos a las jaulas, donde tuvieron acceso libre a comida y agua hasta el final de los estudios. Los animales control ("sham"), utilizados en varios ensayos, fueron sometidos al mismo procedimiento con la excepción de que la MCA no se ocluyó.

Figura 3.3. Esquema ilustrativo que muestra la localización de la arteria cerebral media, y el territorio cortical afectado por el dMCAO (Modificado ([Macrae 2011](#))). A la izquierda del esquema se muestra un dibujo ilustrativo de la vasculatura encefálica a nivel ventral, donde se indica la posición de la arteria cerebral media (MCA), arteria cerebral posterior (PCA), arteria carótida interna (ICA) y externa (ECA) con respecto al polígono de Willis. A continuación se muestran dos esquemas ilustrativos de la sección coronal de interés, donde en la primera ilustración, el sombreado rosáceo (izquierda) muestra el territorio cerebral irrigado por la MCA, y en la segunda (derecha), ilustra el territorio cortical afectado tras su ligación a nivel distal.

3.2.2.3. Cirugías para implante de electrodos de registro. Procedimientos electrofisiológicos.

Los animales fueron anestesiados con una dosis de ketamina (100 mg/kg) y xilacina (10 mg/Kg) y colocados en un instrumento de estereotaxia, protegiendo sus ojos con vaselina, y manteniendo su temperatura corporal en 37 °C durante y después de la cirugía hasta que se recuperaron totalmente de la anestesia. En condiciones asépticas, se realizó una incisión en el cuero cabelludo para exponer el cráneo.

3.2.2.3.1. Registro del electroencefalograma (EEG) y el electromiograma (EMG) en animales sin restricción de movimiento.

Para el registro crónico del EEG se utilizaron dos electrodos situados en la corteza frontal (AP: +0,5mm, L: +2,0 mm y DV: 1,0mm) y parietal (AP: -2,0mm; L: +1,5mm y DV: +1,0mm, con respecto al punto anatómico bregma) del hemisferio inyectado con las distintas soluciones (hemisferio derecho). Para el registro del EMG, utilizado para evaluar el tono muscular, se empleó un tornillo fijado con pegamento a la musculatura cervical. Dos electrodos adicionales (tierra y referencia) fueron colocados en la corteza occipital (AP: -4,0mm; L: -2mm y DV: +1,0mm) del hemisferio no inyectado y en el punto anatómico lambda respectivamente. Todos los electrodos fueron asegurados al cráneo con pegamento (cianoacrilato) y cemento dental (Duraly, Illinois, USA). Los electrodos, previamente soldados a contactos metálicos (sockets) de tipo hembra, se insertaron en un conector de plástico de 6 entradas (PlasticsOne; Cat# M363), y éste a su vez se conectó a un cable con 6 conectores machos, acoplados a un conmutador rotatorio (PlasticsOne; Cat# SL6C). Los registros se llevaron a cabo al menos una semana después del implante de electrodos. Los animales fueron habituados durante al menos 48 horas en jaulas individuales de registro a una temperatura constante de 22°C en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. El conector rotatorio permitió la libertad de movimiento del animal durante el registro de las señales. Las señales de EEG y EMG fueron amplificadas ($0.5-1 \times 10^4$) en un polígrafo (Modelo Grass 700), filtradas (0,5-100Hz para EEG y 20-100Hz para EMG) en un acondicionador de señal (CyberAmp 380, Axon Instruments) y digitalizadas a una frecuencia de muestro de 500 Hz utilizando la plataforma Biomedical Workbench/LabView (National Instruments).

Para el estudio del ciclo vigilia/sueño, se realizó el análisis off-line de los registros EEG/EMG (24 horas de registro) discriminando entre tres estados conductuales: vigilia, sueño NREM (sueño sin movimientos oculares rápidos) y sueño REM (sueño con movimientos oculares rápidos), utilizando un sistema de estadiaje de sueño automatizado basado en MATLAB (Matlab 2008, Mathworks, USA). Las señales de EEG se filtraron en tres bandas de frecuencia: delta (1-4 Hz), theta (4,5-8,5 Hz) y sigma (10-14 Hz), y en el EMG se utilizó un filtrado paso-banda amplio (20-90 Hz). El electrodo colocado sobre la corteza parietal (situado dorsalmente respecto al hipocampo), permitió registrar, por conducción de volumen, la actividad theta hipocampal característica del sueño REM y de la vigilia exploratoria. El electrodo colocado en la corteza frontal facilitó la detección de las

frecuencias corticales más lentas (delta) de la señal de EEG, que son las predominantes durante la fase de sueño NREM. A partir de la densidad espectral de cada época de 5 segundos, calculada mediante la Transformada Rápida de Fourier (FFT), se elaboraron los siguientes índices para diferenciar las épocas de sueño: (1) el producto de la potencia en theta*sigma, (2) el cociente entre las potencias delta/theta y (3) la amplitud del EMG. En la vigilia se observó una elevada actividad EMG junto con un bajo valor de sigma*theta, a diferencia de los periodos de sueño, caracterizados por una escasa actividad en el EMG combinada con un elevado valor de sigma*theta. Asimismo, un valor elevado de delta/theta fue característico del sueño NREM, mientras que un bajo valor de delta/theta lo fue del sueño REM. Estos índices o relaciones entre distintas bandas de frecuencia fueron utilizados para adscribir las distintas épocas de registro a cada estado conductual.

3.2.2.3.2. Registro y análisis de Potenciales evocados.

Las coordenadas para la colocación de los electrodos de registro se basaron en estudios anatómicos ([Paxinos & Franklin 2004](#)) y funcionales ([Alia et al 2016](#), [Ferezou et al 2007](#), [Hira et al 2013](#), [Hira et al 2015](#), [Lim et al 2012](#), [Tennant et al 2011](#)) de la corteza cerebral del ratón. En primer lugar se realizaron 2 trépanos en el cráneo (bregma: AP: -0.5 mm, L: $\pm$ 2.0 mm y DV: +1 mm) donde se colocaron electrodos para el registro de la actividad provocada en la corteza somatosensorial correspondiente al campo representativo de las patas delanteras (S₁FL) de ambos hemisferios. También se realizaron dos craneotomías (bregma: AP: +0.5 mm, L $\pm$ 1.0 mm y ventral: +1 mm) para el implante de electrodos de registro en la corteza motora (m₁CFL) correspondiente a la pata delantera de los dos hemisferios. Finalmente, se implantaron 2 micro-tornillos en la corteza visual (bregma: AP: -3.0 mm; L: $\pm$ 2,0 mm) que sirvieron como electrodos de tierra y referencia (indiferente) respectivamente. Los electrodos fueron asegurados al cráneo con pegamento (cianoacrilato) y cemento dental (Duraly, Illinois, USA). Los electrodos, previamente soldados a contactos metálicos (sockets) de tipo hembra, se insertaron en un conector de plástico de 6 entradas (PlasticsOne; Cat# M363). Tras el implante de electrodos, los animales fueron mantenidos en jaulas permitiéndoles recuperarse al menos 1 semana antes de comenzar los registros. El registro de potenciales evocados se realizó tras la administración intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg) / xilacina (10 mg/Kg). Este tipo de anestesia ha sido empleada para estudiar la organización somatotópica del cortex somatosensorial en monos y ratas ([Patel & Chapin 1990](#), [Stryker et al 1987](#)), encontrándose similitudes en el patrón de activación en relación al registro realizado en animales sin anestesia ([Ferezou et al 2007](#)), a diferencia del uso de anestésicos volátiles como el isoflorano, cuyos efectos deprimiendo los potenciales evocados en humanos y diferentes especies de animales, incluyendo roedores, son sustanciales ([Hayton et al 1999](#), [Sloan & Heyer 2002](#)). No obstante, la profundidad de la anestesia es un factor que puede influir significativamente en las respuestas evocadas. Para reducir la variabilidad entre animales se controló la profundidad anestésica mediante la actividad refleja podal y de pellizo de cola. Además, la señal de EEG fue continuamente monitorizada, descartando los datos de aquellos animales que

en una determina sesión de registro, mostraron amplitudes de EEG por debajo del 50 % de la línea de base (al comienzo del registro). También se descartaron aquellas señales que presentaron artefactos de registro significativos o una reducida calidad durante la adquisición. Los registros electrofisiológicos se realizaron siempre en una ventana de 10-15 min tras la inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina, tiempo durante la cual, la amplitud de respuesta evocada es relativamente estable ([Zandieh et al 2003](#)). Para la estimulación eléctrica del nervio mediano de cada extremidad delantera se utilizaron dos cables rígidos unipolares de 30 AWG (Ariston Electrónica S.A.), uno de ellos conectado a la palma de la mano y el otro a la parte más distal al codo. Los estímulos aplicados se realizaron con una frecuencia de 1 Hz y un ancho de pulso rectangular de 0.5 ms. La magnitud de la intensidad eléctrica aplicada (a amperaje constante) fue 2 veces superior al nivel mínimo de corriente necesario para obtener una respuesta motora supramáxima. Éste nivel mínimo de corriente se define como el valor de intensidad de corriente capaz de provocar un movimiento específico y apreciable visualmente en la pata delantera (flexión palmar de la muñeca) que no se ve sustancialmente modificado al aumentar la intensidad de estimulación. En nuestros estudios, esta magnitud dos veces superior al nivel mínimo estuvo en el rango aproximado de 1-2 mA de corriente. Las señales obtenidas fueron amplificadas ($\times 10^3$), y filtradas (paso de banda 10 Hz a 2 KHz) utilizando un equipo portátil de electromiografía (EMG) para estimulación y adquisición de potenciales evocados (Micromed, Mogliano Veneto, Treviso, Italia) con una frecuencia de muestreo de 20 KHz. Los potenciales evocados se obtuvieron promediando ~ 30-100 respuestas de cada hemisferio obtenidas para cada pata estimulada. A su vez, cada promedio fue repetido al menos 3 veces. Para el registro de los potenciales evocados se realizaron dos aproximaciones experimentales. En la primera, se utilizaron electrodos subdurales para el registro simultáneo de la actividad evocada en la corteza somatosensorial S₁FL de ambos hemisferios (primera parte del objetivo 3). En un segundo tipo de experimentos se implantaron intracerebralmente electrodos para el registro simultáneo, para cada hemisferio, de la actividad evocada en los campos somatosensorial (S₁FL) y motor (m₁CFL) correspondientes a cada pata delantera estimulada.

3.2.3. Estudios conductuales en los animales.

3.2.3.1. Test de la rejilla.

En este test se hizo caminar libremente a los ratones sobre una estructura metálica en forma de rejilla con oquedades cuadradas de 13*13mm², Los animales fueron grabados en video durante un intervalo máximo de 5 minutos. El análisis de los videos se realizó a ciegas para no conocer el tipo de ratón analizado y prevenir cualquier tipo de sesgo. Se determinó el número total de pasos efectuado con ambas patas delanteras (rango típico: 200-400 pasos en total) y el número de total de fallos cometidos con cada una de ellas, de manera independiente. Durante la locomoción del animal, únicamente fueron tomados como fallos aquellos que hicieron perder la estabilidad del

animal o cuando éste no se agarró completamente con la extremidad delantera al borde de cada oquedad, haciendo que dicha extremidad se colara por el interior de la misma (**Figura 3.4.**). En este test se calculó el porcentaje de fallos de cada extremidad delantera respecto al número total de pasos. Como criterio de exclusión, no se consideraron aquellos animales que durante una determinada sesión no caminaron al menos 200 pasos en el tiempo de duración máximo

Figura 3.4. Test de la rejilla. En las imágenes se muestra cómo el animal pierde el control de la estabilidad, haciendo que su extremidad delantera atraviese la oquedad de la rejilla por la que se encuentra caminando.

establecido para este test (5 min).

3.2.3.2. Test del cilindro.

Los animales se colocaron en el interior de un vaso de plexiglás (transparente) con unas dimensiones de 15cm de altura y 10cm de diámetro. Durante la conducta exploratoria vertical, los animales tienden a apoyar (contactar) ambas patas delanteras sobre las paredes del vaso, un indicativo de que no existe una tendencia (lateralidad ~ cero) hacia el uso de una determinada extremidad respecto a la otra. El índice de lateralidad se calculó como $[(\text{contactos extremidad derecha}) - (\text{contactos extremidad izquierda})] / [(\text{contactos extremidad derecha}) + (\text{contactos extremidad izquierda}) + (\text{contactos ambas extremidades})]$. El comportamiento de los animales durante este test fue grabado en video y analizado a ciegas. Como criterio de exclusión, no se consideraron aquellos animales que en una determinada sesión no realizaron al menos 25 contactos sobre las paredes del vaso en el tiempo de duración máxima establecida para este test (5 min).

3.2.3.3. Test del laberinto en Y.

Los animales se colocaron en el centro de un laberinto con forma de Y simétrica (longitud y ancho de cada brazo: 25 X 5 cm), y se les permitió explorarlo libremente durante un tiempo máximo de 5 min. El número total de entradas a los brazos del laberinto y la secuencia de entrada en cada uno de ellos fueron analizados a ciegas a partir del análisis visual de la grabación en video de cada animal durante el test. El porcentaje de alternancias se calculó como el número entradas en los 3 brazos diferentes de manera secuencial, dividido por el número total de alternancias posibles

[(número total de brazos menos 2) *100]. En condiciones normales, sin daño cognitivo (memoria espacial), los valores set/alternancias son relativamente elevados (~ 60 %), indicando que los animales son capaces de recordar el brazo en el que entraron con anterioridad, y explorar un brazo nuevo del laberinto. Como criterio de exclusión, no se consideraron aquellos animales que en una determinada sesión no realizaron al menos 1 alternancia (entrada en cada uno de los tres brazos de manera secuencial).

3.2.4. Evaluación histológica de los cerebros e identificación de poblaciones celulares por citometría de flujo.

3.2.4.1. Identificación de depósitos de fibroína en el tejido cerebral.

Los animales se anestesiaron con una dosis letal de pentobarbital sódico (150 mg/kg) y se perfundieron transcardialmente con PBS frío a pH 7,4, seguido de PFA al 4% en PBS. Tras la fijación, se extrajeron los cerebros permaneciendo 1 semana en PFA al 4% (post-fijación). Posteriormente los cerebros se criopreservaron en una solución al 30% p/v de sacarosa en PBS (D(+)) Sucrose BioChemica; PanReac AppliChem; Cat# A3935) durante al menos 1 semana. En un micrótomos de congelación (Leitz Wetzlar), se obtuvieron secciones de 30µm de grosor en libre flotación, que posteriormente fueron montadas sobre portaobjetos recubiertos de poly-L-lisina (Menzel-glaser Superfrost ultra plus; Thermo scientific; Cat# D-38116), y teñidas con tinción de Nissl (azul de toluidina; Sigma Aldrich; Cat# T3260.), de acuerdo con procedimientos estándar. La captura y reconstrucción de las imágenes se realizó mediante el programa NIS-Elements (Nikon Instruments, Barcelona, España), empleando una cámara CCD (Olympus DP70) acoplada a un microscopio invertido (Olympus BX51; Olympus Medical Systems Europa, Alemania). La cuantificación del volumen de los depósitos de fibroína se realizó delineando y midiendo (ImageJ; NIH) el área total ocupada por el implante (claramente identificada después de tinción con azul de toluidina) en secciones coronales seriadas, y multiplicando las áreas resultantes por el espesor de cada sección (30 µm). Las secciones se analizaron en el intervalo de -450 a + 450 µm a lo largo del eje antero-posterior con respecto al sitio de inyección estriatal (0-µm), intervalo que contuvo la totalidad del biomaterial inyectado.

3.2.4.2. Análisis de la respuesta inflamatoria en el tejido cerebral en respuesta al implante de fibroína.

Primeramente se obtuvieron secciones coronales de cerebros tal y como se describió previamente. La tinción inmunohistoquímica para la identificación de poblaciones celulares inflamatorias se realizó sobre secciones en libre flotación. Se empleó un anticuerpo anti-CD45 conjugado con APC (BD Pharmingen, La Jolla, CA; Cat# 559864) para la identificación de microglía reactiva (CD45^{low}) y leucocitos (CD45^{high}) de sangre periférica. En estos estudios, se utilizaron ratones infartados como control positivo de inflamación (**Figura 3.5. A**). Las secciones

coronales correspondiente al grupo control y a los distintos grupos experimentales fueron bloqueadas con 5% de suero de cabra en PBS durante toda la noche a 4°C, y posteriormente incubadas con el anticuerpo anti-CD45 disuelto en 200 µl de PBS con 5% de suero de ratón (dilución 1:50). Tras la incubación, las secciones teñidas se lavaron con 10% suero de cabra en PBS y se cubrieron con medio de montaje de fluorescencia (ProLong Gold Antifade Reagen; Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA, USA; Cat# P36930). Las muestras se examinaron y las imágenes se adquirieron mediante un microscopio de fluorescencia (Leica DMI3000, Nussloch, Alemania).

En otro set de experimentos se cuantificó el contenido de células inflamatorias mediante técnicas de citometría de flujo. Los animales se perfundieron con PBS frío (pH 7.4), y tras la extracción de los cerebros, se localizó la región del estriado cerebral, el sitio de inyección del biomaterial. Una porción de tejido cerebral (~20mm³) conteniendo el estriado, fue disgregada con PBS frío empleando los extremos rugosos de dos portaobjetos de vidrio. La suspensión celular obtenida fue filtrada a través de un “cell strainer” de 100µm. Las células fueron centrifugadas a 1.500 r.p.m. durante 10min y finalmente resuspendidas e incubadas (25min a 4°C) en un volumen final de 200 µl de PBS conteniendo 0,5% p/v de anticuerpo anti-CD45 (BD Pharmingen, La Jolla, CA; Cat# 559864;) y 5% de suero de ratón. La citometría de flujo se llevó a cabo en la forma comentada anteriormente (sección 3.1.5.). Como grupos control se utilizaron cerebros de ratones infartados

Figura 3.5. Respuesta inflamatoria en el cerebro de animales infartados. (A) Imágenes representativas de secciones coronales de cerebros tras la tinción con un anticuerpo anti-CD45. Arriba y abajo se muestran campos representativos correspondientes a la corteza cerebral de ratones sin ninguna cirugía (hemisferio intacto o NO dañado) y animales infartados respectivamente. En éste último caso, nótese la presencia poblaciones celulares positivas para CD45. La línea de puntos delimita la superficie de la corteza cerebral. (Barra de escala; 200 µm). (B) Ejemplos de las ventanas de adquisición de citometría para la identificación y cuantificación de poblaciones celulares positivas para CD45 (fluorescencia positiva a APC) en la corteza cerebral de animales sanos e infartados.

(control positivo de inflamación) y sin tratamiento alguno (control negativo) (**Figura 3.5. B**).

3.2.4.3. Estudios de toxicidad celular en respuesta al implante de fibroína.

Para examinar la posible mortalidad celular en el territorio cerebral cercano al implante, se realizó una inyección intravenosa de yoduro de propidio (IP, 10mg/Kg) en PBS a través del seno venoso retroorbital. Dado que en condiciones normales el IP no puede atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) ([Hussain et al 1985](#), [Unal Cevik & Dalkara 2003](#)), se practicó una craneotomía en los animales implantados, para comprometer la integridad de la BHE y facilitar la llegada del IP desde la sangre al cerebro. La pérdida de integridad de la BHE inducida por la craneotomía pudo ser demostrada en un conjunto preliminar de experimentos destinados a tal fin, empleando 3 grupos de animales; (a) sin cirugía (controles de integridad de la BHE); (b) ratones craneotomizados; y (c) animales infartados como control positivo adicional de pérdida de integridad de la BHE inducida por la isquemia cerebral ([Wang et al 2016a](#), [Yan et al 2015](#)). Los tres grupos de animales fueron inyectados intravenosamente con la molécula fluorescente 5-(6)-carboxifluoresceína (CF; Molecular Probes® Life Technologies™; Cat# C194, 300µM en PBS), que en condiciones normales, con la BHE intacta, no pudo llegar al cerebro, pero si hacerlo en ratones craneotomizados y ratones infartados, demostrándose la ruptura de la BHE en estos dos grupos de animales (**Figura 3.6. A**). Para los estudios de citotoxicidad celular se emplearon dos grupos de ratones control; craneotomizados (controles negativos de citotoxicidad) y animales infartados (positivos para citotoxicidad), detectándose en éstos últimos, tras la administración de IP intravenoso, la muerte/apoptosis tardía de poblaciones celulares en el tejido cerebral dañado (**Figura 3.6. B y C**).

En base a estas evidencias, en los ratones implantados con el biomaterial o con PBS primeramente se practicó una craneotomía 5 min antes de la administración intravenosa de IP para abrir la BHE y favorecer la entrada del IP al cerebro y marcar la posible mortalidad celular derivada del implante. Los animales fueron sacrificados 5 horas después de la administración de IP, mediante la inyección letal de pentobarbital sódico (150 mg/kg), y perfundidos transcardialmente con PBS frío a pH 7,4 seguido de PFA al 4% en PBS. Los cerebros fijados fueron extraídos, post-fijados al menos durante 1 semana en PFA 4%, y crioprotectados en sacarosa al 30% en PBS, antes de su procesamiento en un micrótopo de congelación (Leitz Wetzlar). Las secciones coronales se cubrieron con medio de montaje de fluorescencia y las muestras se examinaron en un microscopio de fluorescencia (Leica DMI3000, Nussloch, Alemania) (**sección resultados Figura 4.3. A**). En otro set de experimentos se cuantificó por citometría de flujo el contenido de células IP positivas (células necróticas o apoptóticas tardías). La disgregación del tejido se realizó tal y como se describió en la sección previa (3.2.4.2.). La suspensión celular obtenida se fijó con PFA al 4% en PBS durante 20min, y la adquisición de eventos por citometría (**sección resultados Figura 4.3. B y C**) se realizó en el canal de PE (emisión a 530nm) con un láser de excitación a 488nm en la forma comentada en la sección 3.1.5.

Figura 3.6. Evaluación de la muerte celular en el cerebro de animales sometidos a un infarto cortical. (A) imágenes representativas de tejido cerebral de animales sin cirugía (a y e), craneotomizados (b y d) y sometidos a un infarto cortical (c y f). Las imágenes se muestran a bajos (a-c; barra de escala 200µm) y altos (e-f; barra de escala 50µm) aumentos respectivamente. Estos estudios permitieron confirmar que en los ratones craneotomizados así como en los infartados se produce una pérdida de la integridad de la barrera hematoencefálica y el tejido cerebral se tiñe de forma inespecífica con carboxyfluoresceína (CF; 300µM), cuando ésta es inyectada intravenosamente. (B) Imágenes representativas de la corteza cerebral para la identificación de células IP positivas (necróticas y apoptóticas tardías) en el hemisferio dañado de animales sometidos a un infarto cortical (control positivo) en relación a animales sanos sometidos exclusivamente a una craneotomía (hemisferio intacto No dañado). La línea de puntos delimita la superficie de la corteza del hemisferio no dañado, un límite difícilmente evaluable en animales infartados, donde existe una gran pérdida de integridad cortical. Las células IP positivas se localizaron exclusivamente en el hemisferio dañado de ratones infartados (barra de escala; 200µm). (C) Ejemplos de las ventanas de adquisición de citometría para la identificación de poblaciones celulares IP positivas en animales sanos sometidos exclusivamente a una craneotomía (hemisferio intacto no dañado) e infartados (hemisferio dañado).

3.2.4.4. Estudios estereológicos para la identificación de MSC/P EGFP positivas en el tejido cerebral.

Primeramente se implantaron animales con MSC/P solas o MSC/P pre-mezcladas con soluciones de fibroína (en cualquier caso MSC/P derivadas de ratones CAG-EGFP). Los ratones receptores fueron sacrificados a 72 horas 2 y 4 semanas post-implante mediante la inyección letal de pentobarbital sódico (150 mg/kg) y perfundidos transcardialmente con PBS frío a pH 7,4 seguido de PFA al 4% en PBS. Los cerebros fijados fueron extraídos, post-fijados al menos durante 1 semana en PFA 4%, y crioprotegidos en sacarosa al 30% en PBS, antes de su procesamiento en un micrótopo de congelación (Leitz Wetzlar). Las secciones coronales de 30 μm de grosor obtenidas en flotación, fueron posteriormente montadas de forma seriada (300 μm de distancia entre secciones) sobre portaobjetos recubiertos de poly-L-lisina y se cubrieron con medio de montaje de fluorescencia (ProLong). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio de fluorescencia (Leica DMI3000, Nussloch, Alemania), y la semi-cuantificación del número de células MSC/P-EGFP en el tejido subcortical, se realizó primeramente delineando y midiendo (ImageJ; NIH) el territorio cerebral positivo para la fluorescencia (EGFP_positiva) en las distintas secciones analizadas así como considerando el área promedio ocupada por cada célula individual de $\sim 50\text{-}80\ \mu\text{m}^2$ ($\sim 8\text{-}10\ \mu\text{m}$ de diámetro cuando su morfología es esferoide) (**Figura 3.7.**).

Figura 3.7. Imágenes de MSC/P EGFP positivas en el interior del parénquima cerebral. Imagen correspondiente a poblaciones de células (MSC/P EGFP) implantadas en el estriado cerebral 1 mes post-inyección (barra de escala: 50 μm). Nótese como la morfología celular de las MSC/P inyectadas es de tipo esferoide y como su diámetro celular no es superior a 10 μm . La semi-cuantificación del contenido celular en las secciones coronales analizadas se realizó delineando y midiendo el área fluorescente verde (línea discontinua en blanco), y determinando el número de células en función del área fluorescente verde y la estimación del área ocupada por una única MSC/P ($\sim 50\text{-}80\ \mu\text{m}^2$).

3.2.4.5. Evaluación histológica del infarto cerebral.

La cuantificación del área infartada se realizó en secciones coronales de 1 mm de grosor, incubadas con Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio o cloruro de tetrazolio (TTC; Sigma, St. Louis, MO, USA) tal y como ha sido previamente descrito ([Hatfield et al 1991](#), [Isayama et al 1991](#)). Aproximadamente entre 24-72 horas post-infarto, los animales fueron anestesiados con una dosis letal de pentobarbital sódico (150 mg/kg) y decapitados. Los cerebros se extrajeron y se cortaron en secciones coronales de 1mm de grosor empleando una matriz de acero inoxidable (WPI, Florida, USA; Cat# 72-5032). Las secciones cerebrales se sumergieron a Tª ambiente en una solución de TTC al 1% en solución salina (PBS) durante al menos 10 min, tiempo tras el cual éstas fueron fijadas con PFA al 4% en PBS. El área dañada fue claramente identificada por la ausencia

de tinción al TTC. Todas las secciones fueron fotografiadas y el área infartada en cada sección medida empleando un programa de imagen de libre acceso (ImageJ software; NIH). El volumen de tejido cerebral dañado se calculó cuantificando la región infartada e intacta en cada sección coronal, multiplicando las áreas por el grosor de la sección (1 mm) y sumando los valores de todas las secciones. Debido al edema cerebral que regularmente se produce en el hemisferio afectado, la cuantificación del volumen de infarto en este hemisferio se expresó en relación al volumen total del hemisferio intacto (contralateral), tal y como ha sido previamente descrito ([Barios et al 2016](#)).

3.2.4.6. Cuantificación del edema cerebral y del territorio cortical perdido.

Los animales fueron sacrificados a las 10 semanas post-tratamiento mediante la inyección letal de pentobarbital sódico (150 mg/kg), y perfundidos transcardialmente con PBS frío a pH 7,4 seguido de PFA al 4% en PBS. Los cerebros fijados fueron extraídos, post-fijados al menos durante 1 semana en PFA 4%, y crioprotegidos en sacarosa al 30% en PBS, antes de su procesamiento en un micrótomos de congelación (Leitz Wetzlar). Las secciones coronales de 30 μ m de grosor obtenidas en flotación, fueron posteriormente montadas de forma seriada (300 μ m de distancia entre secciones) sobre portaobjetos recubiertos de poly-L-lisina y teñidas con Nissl (azul de toluidina) tal y como ha sido mencionado previamente (sección 3.2.4.1.). La captura y reconstrucción de las imágenes se realizó mediante el programa NIS-Elements (Nikon Instruments, Barcelona, España), empleando una cámara CCD (Olimpus DP70) acoplada a un microscopio invertido (Olimpus BX51; Olympus Medical Systems Europa, Alemania). La cuantificación del porcentaje de edema y tejido cortical perdido se realizó delineando y midiendo (ImageJ; NIH) el área subcortical y cortical del hemisferio no afectado, y comparándolo con el área subcortical (edema) y cortical (tejido perdido) del hemisferio infartado en cada una de las secciones analizadas.

3.3. Análisis estadístico.

El paquete R y SigmaPlot (SigmaPlot v12.0, Systat, Alemania) se utilizaron en los análisis estadísticos. Cuando fue aplicable, los valores calculados se expresaron como la media $\pm$ el error estándar de la media (EEM). La significancia entre grupos se realizó utilizando varios modelos estadísticos. En la mayoría de los estudios, primeramente se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para contrastar la hipótesis de igualdad de medias de dos o más grupos. Cuando el resultado fue estadísticamente significativo (rechazo de la hipótesis nula de igualdad de medias), se utilizaron otros métodos estadísticos ("*Tukey*", "*Scheffe* o "*t de student*") para identificar qué grupos presentaban medias diferentes entre sí. El tipo de análisis estadístico utilizado en cada estudio ha sido descrito en la correspondiente leyenda de cada figura de la sección de resultados. Por ejemplo, para examinar en un único grupo, en función del tiempo, la evolución del tamaño del infarto o la progresiva degradación de la fibroína se utilizó ANOVA de un factor. En otro ejemplo, para examinar el curso temporal de actividad evocada, déficits funcionales, inflamación, toxicidad,

proliferación o adhesión celular se utilizó ANOVA de dos factores seguido, en caso de diferencias significativas del test de *“Tukey”*. En los análisis ANOVA de dos factores se consideró la actividad evocada, los déficits, la proliferación, la adhesión, la inflamación o la toxicidad celular variables dependientes, mientras que el factor tiempo y el factor tratamiento (grupos distintos de animales) fueron consideradas como variables independientes. En algunos estudios, cuando se compararon diferencias entre grupos en un único punto temporal, se utilizó el test *“t de student”*. Los estudios de correlación entre distintas variables se determinaron mediante la correlación de *“Pearson”*. Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

IV. RESULTADOS

4.1. Desarrollo y caracterización de un formato de fibroína de la seda adecuado para implante intracerebral.

En modelos animales de daño cerebral, la reducida viabilidad de los injertos celulares en el tejido nervioso ([Bliss et al 2007](#), [Mora-Lee et al 2012](#), [Wang et al 2016b](#)) ha impulsado el uso de distintos biomateriales para crear una barrera física de protección ante la respuesta inmune del tejido huésped, además de proporcionar un sustrato sobre el que las células implantadas puedan adherirse ([Hoban et al 2013](#)), favoreciendo su viabilidad ([Ballios et al 2015](#), [Hoban et al 2013](#)) y logrando una mayor efectividad terapéutica respecto al trasplante único de distintas poblaciones celulares ([Jin et al 2010a](#), [Jin et al 2010b](#), [Jung et al 2015](#)).

Los primeros materiales ensayados como terapia neurorestaurativa basados en hidrogeles sintéticos de 2-polihidroximetilmetacrilato o p(HEMA) y 2-pioglicerolmetacrilato o p(GMA), indujeron fuertes respuestas inflamatorias tras su inyección intracerebral ([Woerly et al 1995](#), [Woerly et al 1990](#)), una limitación en parte achacable al trasplante del biomaterial en estado previo de gel. En la actualidad, el abordaje más extendido es el uso de hidrogeles capaces de gelificar *in situ* tras su inyección intracerebral ([Loh et al 2001](#), [Overman et al 2012](#), [Saeed et al 2012](#), [Zhong et al 2010](#)), lo que hace menos invasiva su aplicación terapéutica, y ofrece una ventaja sustancial como es la co-inyección junto con las células terapéuticas ([Nih et al 2016](#), [Uemura et al 2010](#)). Las características deseables de cualquier biomaterial es su degradación *in vivo* una vez se haya proporcionado un efecto terapéutico, y que los productos derivados de esa degradación no induzcan reacciones citotóxicas ni inflamatorias de consideración, permitiendo el restablecimiento funcional del tejido dañado. La integración de células terapéuticas en hidrogeles basados en colágeno ([Yu et al 2010](#)), alginato ([Emerich et al 2010](#)), PLGA ([Bible et al 2012b](#)), ácido hialurónico ([Ma et al 2007](#)), o matrigel ([Jin et al 2010a](#)) ha demostrado ser efectiva para la mejoría funcional de animales con daño cerebral. En el caso concreto de la fibroína de la seda (SF), este material resulta idóneo para este tipo de aplicaciones debido principalmente a sus propiedades inertes y de nula inmunogenicidad respecto a otros biomateriales ([Enomoto et al 2010](#), [Meinel et al 2005](#)). Aunque la SF ha mostrado una excelente biocompatibilidad con distintos tejidos y células terapéuticas ([Calabrese & Kaplan 2012](#), [Hu et al 2016](#), [Kim et al 2005](#), [Wang et al 2008b](#)), sin embargo no ha sido empleada con anterioridad en estudios de regeneración cerebral, motivo por el cual se planteó abordar su posible utilidad en este campo.

En este objetivo se desarrolló un formato inyectable de SF (hidrogel) que fue caracterizado mecánica y estructuralmente. Asimismo se evaluó la respuesta inflamatoria, la citotoxicidad y los posibles déficits sensorimotrices y cognitivos originados por el implante intracerebral de este biomaterial.

4.1.1. Desarrollo de un sistema inyectable basado en hidrogeles de fibroína de la seda.

El proceso de gelificación de la fibroína se origina por la formación de enlaces covalentes entre las cadenas peptídicas de la proteína ([Matsumoto et al 2006](#)). La formación de estos enlaces puede ser lograda al exponer la solución de fibroína a solventes polares que modifiquen el pH, por calentamiento, por reducción de su contenido en agua o mediante sonicación ([Matsumoto et al 2006](#), [Wang et al 2008a](#)). La modificación del pH como método de obtención de los hidrogeles se descartó puesto que para su aplicación *in vivo*, era recomendable obtener el gel a un pH fisiológico. La reducción del contenido en agua o el calentamiento de la solución de fibroína fueron también desestimados porque en estudios previos con ambos procedimientos se obtuvieron tiempos de gelificación de la fibroína en el orden de días ([Matsumoto et al 2006](#)), valores que resultaban demasiado alejados de la ventana temporal deseada para la integración celular y el implante intracerebral del biomaterial, que inicialmente estimamos debería no ser mayor de 20 minutos. Durante la gelificación *in situ*, este intervalo de tiempo podría evitar una excesiva dispersión del biomaterial y de las células terapéuticas implantadas hacia zonas alejadas de la zona de inyección. El método finalmente seleccionado para la obtención de los hidrogeles fue la sonicación, ya que en estudios previos, este tratamiento permitió obtener geles en intervalos de tiempo relativamente cercanos al requerido ([Wang et al 2008a](#)).

En una primera aproximación sometimos las soluciones de fibroína a un único pulso de ultrasonidos de 30 segundos de duración, con amplitudes de intensidad variables (20%, 40% y 60%; el máximo permitido por el equipo). Consideramos que la solución había gelificado cuando mediante un criterio visual, la solución dejaba de ser fluida, y al invertir el tubo "*falcon*" que la contenía, ésta no se derramaba fuera del mismo. En estas condiciones de sonicación, el tiempo de gelificación en dos concentraciones distintas de fibroína (1 y 2%) fue superior a 120 min (**Tabla 4.1.**). Al someter a las soluciones de fibroína a dos pulsos consecutivos de ultrasonidos a la máxima intensidad (60%), durante 30 segundos de duración cada uno, y con un intervalo de descanso de 1 minuto entre ellos, se consiguió reducir el tiempo de gelificación a ~ 82 y ~12 minutos para las soluciones al 1% y 2% de fibroína respectivamente (**Tabla 4.1.**).

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles obtenidos se examinaron mediante estudios de compresión uniaxial. Para ello, se emplearon las soluciones de fibroína al 1% y 2%, que gelificaron en el rango de 12 y 82 minutos aproximadamente. Para el estudio se generaron moldes cilíndricos de aproximadamente 10.4 mm de diámetro y 10 mm de altura, sobre los que se aplicaron fuerzas de compresión para su caracterización mecánica, en las 24 horas posteriores a la gelificación.

Tabla 4.1. Relación entre la concentración de fibroína, tiempo y amplitud de sonicación con el tiempo de gelificación. En la mayor parte de las condiciones el tiempo de gelificación fue superior a 120 minutos, excepto en las condiciones marcadas con (*) o (**), donde se redujeron los tiempos a aproximadamente 82 y 12 minutos respectivamente. Se ha marcado con dos asteriscos (**) la condición elegida (11-12 minutos) para el desarrollo de los objetivos primero, segundo y cuarto de esta tesis.

Concentración de la solución de SF	Parámetros de sonicación		Tiempo de gelificación / min	
	Tiempo (s)	Amplitud (%)	Muestra 1	Muestra 2
1 % (p/v)	30	20		
	30	40		
	30	60		>120
	30 + 30	20		
	30 + 30	40		
	30 + 30 (*)	60	86	77
2 % (p/v)	30	20		
	30	40		
	30	60		>120
	30 + 30	20		
	30 + 30	40		
	30 + 30 (**)	60	11	12

En la **Tabla 4.2.** se muestran los resultados obtenidos para los hidrogeles ensayados en dos condiciones diferentes (aire e inmersos en PBS). La deformación (ϵ_u) soportada por los hidrogeles fue cercana al 10% independientemente de la concentración del biomaterial. Sin embargo, los valores de rigidez (módulo elástico, E) y tensión a la rotura (σ_u) dependieron del porcentaje de fibroína en la solución inicial. Además, para cada valor específico de concentración, las tres propiedades mecánicas estudiadas no se modificaron en función de la humedad del hidrogel, sugiriendo que una leve deshidratación ocasionada por la manipulación de la solución, por la sonicación o por el procedimiento de inyección intracerebral, en principio no alteraría ninguno de los parámetros estudiados. Por el contrario, una pérdida importante de agua durante la manipulación de la muestra sí que podría tener efectos sustanciales sobre la concentración de fibroína, variando el tiempo de gelificación y modificando el módulo elástico y la tensión a la rotura.

Tabla 4.2. Resumen de las propiedades mecánicas de los hidrogeles de la fibroína de la seda al 1% y 2% (p/v), incluyendo el módulo de elasticidad, el alargamiento a la rotura y la resistencia a la rotura en kPa a partir de los ensayos realizados en aire y solución salina (PBS).

Concentración SF	Módulo de elasticidad (E) (KPa)		Alargamiento a la rotura (ϵ_u) (%)		Resistencia a la rotura (σ_u) (kPa)	
	aire	salino	aire	salino	aire	salino
1 % (w/v)	6.3 $\pm$ 0.6	6 $\pm$ 1	8 $\pm$ 2	9.8 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.1	0.49 $\pm$ 0.07
2 % (w/v)	35 $\pm$ 1	30 $\pm$ 10	8.6 $\pm$ 0.3	10 $\pm$ 2	2.7 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.6

Los datos se muestran como la media $\pm$ error estándar de la media (EEM) de 2 experimentos independientes.

Dado que la finalidad de los hidrogeles fue su utilización como vehículo para el implante de células en el tejido cerebral y que el módulo elástico de los hidrogeles de fibroína al 1 y 2% fue del 6 $\pm$ 1 y 30 $\pm$ 10 kPa respectivamente, se determinó que los hidrogeles al 2% podrían resultar mucho más adecuados para la aplicación propuesta, ya que presentaron módulos elásticos en el rango descrito previamente para el tejido cerebral (25-50 KPa) ([Murphy et al 2012](#), [Tang-Schomer et al 2014b](#)). Además de su módulo de compresibilidad, la solución de fibroína al 2 % mostró tiempos de gelificación relativamente rápidos (~10 min). Por tanto, con todas las salvedades de estos estudios que fueron realizados *in vitro*, la solución de fibroína al 2% sometida a dos pulsos consecutivos de sonicación, (2 pulsos de 30 seg) de la máxima amplitud proporcionada por nuestro equipo (60 %), podría resultar ideal para la encapsulación celular, su inyección intracerebral y posterior gelificación en la zona de implante.

El proceso de gelificación tras la sonicación de doble pulso se analizó en detalle empleando técnicas de espectrofotometría de UV/Visible y espectroscopía ATR-FTIR (**Figura 4.1.**). El análisis mediante espectrofotometría de UV/Visible nos permitió estudiar la evolución temporal del proceso de gelificación. La generación de microestructuras heterogéneas durante la gelificación es responsable de la dispersión de la luz, generando un aumento de la turbidez de la muestra, que puede ser detectada por un aumento en la Densidad Óptica (DO) de la solución ([Matsumoto et al 2006](#)). Pese a que el criterio visual nos indicó que la gelificación tras el doble pulso de sonicación se produjo en torno a los 10-12 min, al analizar la turbidez de la muestra sonicada a 550 nm, se observó como la gelificación aumentó linealmente durante la primera hora (**Figura 4.1. A**), hasta estabilizarse en torno a las 2h 30min.

Por otro lado, los cambios en la organización de la estructura secundaria de la fibroína se han relacionado con el grado de gelificación del biomaterial ([Matsumoto et al 2006](#)). Las primeras etapas en la formación del hidrogel son consecuencia de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, que son seguidas de la formación de enlaces tipo lámina- β ([Matsumoto et al 2006](#)). En el espectro de infrarrojo (IR) de las proteínas se observan bandas denominadas amidas,

generadas a partir de la vibración de los átomos involucrados en el enlace peptídico (C=O). La banda amida I es la más comúnmente utilizada en el análisis de la estructura de proteínas ([Barth 2007](#)), y se localiza entorno a los 1600 a 1700 números de onda / cm^{-1} . Una elevada cantidad de enlaces de tipo alpha-hélice hacen que la banda amida I se desplace hacia valores cercanos a los 1640 cm^{-1} , y por el contrario, cuando su contenido en lámina- β es superior, la banda amida I se localiza cercana a los 1620 cm^{-1} números de onda. Para conocer los cambios progresivos en la estructura secundaria de la fibroína en solución en función de la gelificación se estudió el espectro ATR-FTIR (Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier de Reflectancia total atenuada). Antes de la sonicación, se observó un pico en la banda amida I en torno a los 1640 cm^{-1} que denotó un elevado contenido en alpha-hélice en la estructura secundaria de la proteína (**Figura 4.1. B; trazado gris**). Cinco horas después de la sonicación de doble pulso, la banda amida I se localizó en valores cercanos a los 1620 cm^{-1} números de onda (**trazado negro**), como consecuencia de un enriquecimiento en la formación de enlaces tipo lámina- β en su estructura, un hecho compatible con una solución muy gelificada. Sin embargo, para las soluciones evaluadas 10 minutos después de la sonicación, la banda amida I mostró un pico mayoritario entorno a los 1640 cm^{-1} (**trazado rayado**), aunque se detectó un codo en el espectro a 1620 cm^{-1} , indicando la presencia de un pequeño contenido en lámina- β . Este moderado contenido en lámina- β en los hidrogeles, 10 minutos después de la sonicación, pareció ser suficiente para que la solución de fibroína dejase de ser fluida según el criterio visual mencionado con anterioridad.

Se sabe que la micro-arquitectura de los poros en “*scaffolds*” de distintos materiales juega un papel crítico en la ingeniería de tejidos, afectando al crecimiento, adhesión, migración y proliferación de las células, así como al transporte de nutrientes y productos de deshecho ([Nih et al 2016](#), [Orive et al 2009](#)). Para visualizar la microestructura de los hidrogeles obtenidos, empleamos microscopía electrónica de barrido por congelación (MEB) ([Karimi & Khodadadi 2016](#)). Veinticuatro horas después de la sonicación, los estudios de microscopía revelaron la existencia de microporos (~100-200 nm) en la estructura de los hidrogeles (**Figura 4.1. C**). Aunque en estudios previos esta estructura porosa permitió el crecimiento y diferenciación de células madre de origen mesenguimal ([Floren et al 2016](#), [Sun et al 2016](#)), así como la liberación de fármacos ([Kim & Park 2016](#)), desconocíamos si en nuestras condiciones experimentales, la retención y supervivencia de las MSC/P integradas en los hidrogeles podría estar comprometida *in vitro* e *in vivo*, una cuestión que fue motivo de estudio en el segundo objetivo de esta tesis.

Figura 4.1. Caracterización del proceso de gelificación *in vitro* de la fibroína de la seda. (A) Variaciones en la densidad óptica (550nm) a lo largo del tiempo tras la sonicación. (B) Evaluación mediante espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR-ATR) del espectro de la banda amida I antes ($t = 0$ min), 10 minutos y 5 horas después de la sonicación. En (A) y (B), para el análisis de la densidad óptica y la FTIR-ATR se emplearon soluciones de fibroína al 2% (p/v) a las que se aplicaron 2 pulsos consecutivos de 30 seg al 60% de la amplitud máxima del sonicador. (C) Campos representativos de hidrogeles de fibroína (2%) adquiridos mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Se muestran imágenes a $10^5\times$ (imagen izquierda) y $2*10^5\times$ (imagen derecha), aumentos.

4.1.2. Implante *in vivo* de hidrogeles de fibroína: modificaciones a nivel celular y tisular.

Una vez seleccionados los parámetros de sonicación considerados los más adecuados para la finalidad perseguida, se diseñaron una batería de experimentos para examinar la biorespuesta tisular y la función cerebral de ratones implantados con el biomaterial. El objetivo de dichos estudios fue estudiar la tolerabilidad de la fibroína en el tejido cerebral, una información conceptualmente importante de conocer, pues si este biomaterial producía una toxicidad elevada, la hipótesis y el resto de objetivos generales de esta tesis podrían haberse visto comprometidos.

En una primera fase de estudio, los animales participantes se dividieron en dos grupos de ensayo (**tabla 4.3.**), un grupo de ratones fue inyectado con una solución de fibroína (SF) al 2 % previamente tratada con dos pulsos de sonicación tal y como se describió previamente, mientras que un segundo grupo de ratones (grupo control) fue inyectado con una cantidad equivalente de solución salina (PBS). Empleamos el PBS como control de nuestro ensayo puesto que es el vehículo donde se integra la fibroína, y además ha sido ampliamente empleado como vehículo para la liberación de fármacos y/o células terapéuticas en el parénquima cerebral ([Yang et al](#)

2009a). El trasplante intracerebral se realizó en el estriado, una estructura subcortical de la que a su vez forman parte los núcleos putamen y caudado. En modelos experimentales de daño cerebral y neurodegeneración, esta región ha sido comúnmente utilizada para albergar el implante de distintos biomateriales, sólo o en combinación con distintas poblaciones celulares incluyendo células madre pluri- y multi-potentes ([Aebischer et al 1994](#), [Bible et al 2012b](#), [Inden et al 2005](#), [Liang et al 2013](#), [Nisbet et al 2009](#), [Tresco et al 1992](#), [Yang et al 2009a](#)).

Una primera observación derivada de este estudio fue la elevada tasa de supervivencia de los ratones inyectados con el biomaterial o con la solución salina (PBS) (**Tabla 4.3 y 4.4**), con porcentajes de supervivencia superiores al 90 % en las primeras 48 horas post-implante. Más allá de este punto temporal no se produjo la muerte de más animales, indicando que la mortalidad similar observada en ambos grupos durante estas primeras 48 horas post-inyección, estuvo probablemente relacionada con el propio procedimiento quirúrgico de la cirugía estereotáxica.

Tabla 4.3. Número total de estudios y animales empleados para examinar la bio-respuesta del tejido cerebral en los animales inyectados con PBS y soluciones sonicadas de fibroína.

Ensayos (**)	Animales inyectados		Animales vivos (48 horas)	
	Salino (n)	Fibroína (n)	Salino (n)	Fibroína (n)
<i>Identificación de depósitos de fibroína, estudios de inflamación y muerte celular. (Tinciones histológicas; N=4)</i>	24	24	24	24
<i>Cuantificación de la inflamación. (Citometría de flujo; N=3)</i>	24	24	23	21
<i>Cuantificación de la muerte celular. (Citometría de flujo; N=2)</i>	18	18	18	18
Número total ratones	66	66	65	63

En todos los estudios la mortalidad se restringió a las primeras 24-48 horas tras la inyección, y fue similar en ambos grupos. Dentro de la tabla no se incluyen los ratones empleados como controles positivos o negativos de la inflamación o muerte celular; isquemia (n=6-9) y ratones no inyectados (n=6-9). En la tabla, N, indica el número de experimentos independientes; n, el número de ratones totales por grupo.

Los animales que sobrevivieron se sacrificaron a distintos puntos temporales post-inyección, examinándose en primer lugar, la presencia de los hidrogeles de fibroína en el parénquima cerebral. La tinción de Nissl (azul de toluidina) nos reveló la existencia de depósitos de fibroína en el estriado de los animales (**Figura 4.2. A y C; paneles ii**). En los cortes coronales analizados, que se extendieron ~ 900 µm a lo largo del eje antero-posterior, cuantificamos el volumen total ocupado por el hidrogel, observándose una reducción del mismo a lo largo del mes analizado (**Figura 4.2. B**). Ésta reducción fue compatible con la progresiva degradación del biomaterial en el tejido cerebral a lo largo del tiempo tras el implante. El análisis histológico reveló la existencia de regiones con una elevada acumulación celular marcada con azul de toluidina, denotando áreas de hiperdensidad celular, principalmente localizadas en los bordes de los depósitos de fibroína (**Figura 4.2. C; panel ii**) y en menor medida en el área de inyección, en los ratones tratados con el PBS (**Figura 4.2. C; panel i**). Estas regiones hiperdensas resultaron más evidentes 72 horas

después del implante de la fibroína o de la inyección del PBS, y su presencia se redujo considerablemente a lo largo del tiempo de estudio (**Figura 4.2. C; panel ii**).

Figura 4.2. Estudio histológico e identificación de depósitos de fibroína en el parénquima cerebral. (A) Imágenes representativas de cortes coronales de cerebro correspondientes a ratones inyectados con volúmenes equivalentes de PBS (panel i) o de fibroína (panel ii) y teñidos posteriormente con Nissl, a 72 horas, 2 semanas o 4 semanas después de la inyección intracerebral en el estriado (caudado-putamen). Las flechas señalan el punto de inyección de PBS (panel i) o la zona del implante que contiene los depósitos de fibroína (panel ii), a lo largo del tiempo de estudio. (B) Curso temporal de la degradación de los depósitos de fibroína. Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 4 experimentos independientes, con 24 ratones en total; 8 ratones por punto temporal. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre puntos temporales (Análisis Unidireccional de la Varianza (ANOVA de un factor); $*p<0,05$). (C) Imágenes a mayor aumento de los campos señalados con flechas en el panel "A". Las puntas de flecha se corresponden con zonas de hiperdensidad celular, que se localizan principalmente en los bordes de los depósitos de fibroína (panel ii), o en el sitio de inyección del PBS (panel i), y fueron más evidentes a tiempos cortos tras la inyección. En el panel ii se muestran imágenes a mayor resolución de los campos señalados con puntas de flecha.

Dado que el azul de toluidina puede marcar poblaciones neuronales y gliales ([Mora-Lee et al 2012](#), [Ramanathan et al 2006](#)), la hiperdensidad celular podría estar relacionada con la acumulación de astrocitos reactivos y microglía (células inmunes residentes del SNC, que son activadas en respuesta a la liberación de ATP por neuronas o células gliales dañadas,) o incluso leucocitos periféricos infiltrantes (neutrófilos, macrófagos, linfocitos T). La acumulación de estas poblaciones celulares podría representar parte de la respuesta inflamatoria asociada con la presencia del biomaterial en el tejido huésped.

Figura 4.3. Análisis de la respuesta inflamatoria en el estriado de ratones implantados con fibroína. (A) Imágenes representativas correspondientes a la región del estriado teñidas inmunohistoquímicamente con el anticuerpo anti-CD45 a distintos puntos temporales tras la inyección de PBS (panel i) o de fibroína (panel ii). Las líneas de puntos delimitan los depósitos de fibroína, y las puntas de flecha apuntan hacia el interior del biomaterial. Las poblaciones celulares CD45⁺ se localizaron principalmente en los bordes de los depósitos de fibroína y en la zona de inyección en el grupo de ratones inyectados con PBS. (B) Ejemplos de las ventanas de adquisición utilizadas en la citometría de flujo para la identificación de poblaciones de células CD45⁺ en los animales inyectados con PBS o fibroína. (C) Cuantificación inmunofenotípica de células CD45⁺ tras la inyección de PBS (barras blancas) y fibroína (barras negras). Las barras rayada y gris representan el porcentaje de células CD45⁺ en animales no inyectados (hemisferio no dañado) e infartados (hemisferio dañado) respectivamente. Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes con un mínimo de 21-23 animales por grupo (PBS o fibroína) y 9 ratones en cada grupo control (no inyectados o infartados). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los distintos grupos con respecto a los ratones no inyectados (análisis doble de la varianza, (ANOVA de dos factores) seguido del test de *Tukey* o el test de *Student*; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Mediante técnicas inmunohistoquímicas y de citometría de flujo, examinamos si el linaje celular acumulado en los bordes de los depósitos de fibroína podría ser de tipo inflamatorio. En las secciones coronales del cerebro de los dos grupos de animales inyectados (**Figura 4.3. A**) identificamos la presencia de células positivas para CD45, un marcador de linaje hematopoyético y microglial. En el caso de los animales trasplantados con los hidrogeles de fibroína, las células CD45⁺ se localizaron en los bordes de los depósitos de SF (**panel ii**) y en el sitio de inyección en el caso de los animales inyectados con PBS (**panel i**). Esta localización es consistente con la idea de que varias poblaciones de células inflamatorias contribuyen a la hiperdensidad celular observada en los estudios realizados con azul de toluidina. En ambos grupos de ratones se observó una clara presencia de células inflamatorias en las primeras 72 horas tras la inyección del biomaterial o del PBS, seguido de una progresiva reducción en el número de células inflamatorias, alcanzando niveles indetectables a las 4 semanas post-trasplante.

Los estudios de citometría de flujo corroboraron este patrón temporal de respuesta inflamatoria (**Figura 4.3. C**), con un incremento en el porcentaje de células CD45⁺, 72 horas tras la inyección respecto al porcentaje de células CD45⁺ detectadas en el cerebro de animales no inyectados. Este incremento fue más marcado en los animales trasplantados con SF (**barras negras**), que en los inyectados con la solución salina (**barras blancas**) aunque sin alcanzar diferencias significativas entre ambos grupos. De forma similar a los estudios histológicos, a lo largo del tiempo post-inyección el porcentaje de células CD45⁺ se redujo considerablemente hasta alcanzar valores similares a los detectados en el cerebro de animales no inyectados (**barra rayada**).

También se examinó la posible existencia de muerte celular derivada del implante de los hidrogeles de fibroína. En los animales implantados se inyectó yoduro de propidio (IP), un fluorocromo con gran afinidad por el ADN nuclear capaz de identificar aquellas células que tienen comprometida la integridad de su membrana plasmática, básicamente células necróticas y apoptóticas tardías. En los estudios histológicos, las células IP⁺ se localizaron en regiones cerebrales cercanas al punto de inyección del PBS (**Figura 4.4. A; panel i**) o bordeando los depósitos de SF (**Figura 4.4. A; panel ii**). El número de células IP⁺ fue superior a las 72 horas post-inyección, y se redujo considerablemente a lo largo del tiempo de estudio. Este patrón temporal fue también similar en los estudios de citometría de flujo (**Figura 4.4 B y C**), alcanzado mayores porcentajes de células IP⁺ a las 72 horas post-inyección, tanto en los animales trasplantados con SF (**barras negras**) como en los inyectados con el PBS (**barras blancas**). A lo largo del tiempo de estudio, el porcentaje de células muertas disminuyó gradualmente hasta alcanzar, tras 4 semanas post-implante, valores cercanos a los de animales no inyectados (**barra rayada**).

Figura 4.4. Análisis de la mortalidad celular en el estradiol de animales implantados con fibroína. (A) Campos representativos del estradiol (secciones coronales) de animales inyectados con PBS (panel i) o fibroína (panel ii) mostrando fluorescencia positiva para Ioduro de propidio (IP). A tiempos cortos, las células muertas (necróticas y/o apoptóticas tardías) se localizaron principalmente en regiones cercanas al sitio de inyección de PBS o rodeando los depósitos de fibroína, mientras que cuatro semanas después de la inyección no se detectaron eventos positivos. (B) Ejemplos de las ventanas de adquisición empleadas en la citometría de flujo para identificar las células positivas marcadas con IP. (C) Cuantificación del porcentaje de células muertas a lo largo del tiempo tras la inyección intraestriatal de PBS (barras blancas) y fibroína (barras negras). Las barras rayada y gris representan el porcentaje de células muertas en los animales no inyectados (hemisferio no dañado) e infartados (hemisferio dañado) respectivamente. Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 2 ensayos independientes, con un mínimo de 18 animales por grupo (PBS o fibroína), y 6 ratones en cada grupo control (no inyectados o infartados). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los distintos grupos con respecto al grupo de animales no inyectados (ANOVA de dos factores, seguido del test de *Tukey* o el test de *Student*; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

En resumen, el implante de fibroína en el estriado produjo, tras 72 horas post-inyección, una respuesta inmune y de muerte celular de cierto grado. Sin embargo, ambas respuestas fueron transitorias y su intensidad se redujo considerablemente en las sucesivas semanas. La ausencia de respuesta a las 4 semanas no pareció estar relacionada con la completa degradación del biomaterial, puesto que su presencia siempre pudo ser detectada en este punto temporal (**Figura 4.2.**). Además, dado que no se encontraron diferencias apreciables en el patrón temporal de inflamación y muerte celular entre ambos grupos; PBS y fibroína, con toda probabilidad el procedimiento de inyección fue mayoritariamente responsable de los efectos observados en las primeras horas tras el implante.

4.1.3. Implante *in vivo* de hidrogeles de fibroína: evaluación neurofisiológica de los animales.

El siguiente nivel de análisis fue estudiar el efecto del implante de la fibroína sobre el estriado y su relación con la función de varias capacidades cerebrales, distribuyendo a los animales participantes en el estudio según se muestra en la **tabla 4.4.**

Tabla 4.4. Número total de estudios y análisis empleados para examinar la actividad electrofisiológica de los animales trasplantados con los hidrogeles de fibroína.

Ensayos (**)	Animales inyectados		Animales vivos (48 horas)	
	Salino (n)	Fibroína (n)	Salino (n)	Fibroína (n)
<i>Test de comportamiento para evaluación cognitiva y sensorimotora, registros electrofisiológicos.(N=2)</i>	14	13	9	10
<i>Potenciales evocados somatosensoriales, test sensorimotora.(N=2)</i>	10	10	10	10
Número total ratones	24	23	19	20

En todos los estudios la mortalidad se restringió a las primeras 24-48 horas tras la inyección, y fue similar en ambos grupos. En la tabla, N, indica el número de experimentos independientes; n, el número de ratones totales por grupo.

El estriado dorsal, conteniendo los núcleos caudado y putamen, recibe aferencias principalmente de la corteza cerebral, que procesa y proyecta vía talámica nuevamente a la corteza, contribuyendo a la transformación sensorimotora ([Sippy et al 2015](#)). Trastornos neurodegenerativos o daños traumáticos en los ganglios basales como el estriado han sido asociados con alteraciones en la motricidad ([Leisman et al 2014](#)). Por otro lado, el estriado también está involucrado en la adquisición y consolidación de ciertas formas de memoria, como el aprendizaje en roedores frente a estímulos ([Albouy et al 2013](#), [Sippy et al 2015](#)), la memoria

espacial ([Cho et al 2014](#)) y motora de los animales ([Leisman et al 2014](#)), además de participar en la regulación de los ciclos de vigilia-sueño ([Qiu et al 2010](#)). En base a estos antecedentes, por un lado examinamos la coordinación sensorimotora, el aprendizaje motor y la memoria espacial de los animales implantados con el biomaterial. Por otro lado se estudió el ciclo vigilia-sueño y la actividad de la corteza somatosensorial mediante registros electrofisiológicos (**Figuras 4.5. A y 4.7. A**). La finalidad de estos estudios fue obtener una prueba inequívoca de la tolerabilidad del biomaterial sobre la función cerebral en el intervalo de 4-6 semanas tras el trasplante.

El test del laberinto en “Y” (**Figura 4.5. B**) ha sido utilizado ampliamente para evaluar la memoria espacial en roedores, incluyendo el ratón ([Oakley et al 2006](#), [Wei et al 2016](#)). Para comprobar la utilidad de este test en nuestras condiciones experimentales, empleamos ratones transgénicos 5XFAD, en los que se produce una acumulación intensa y rápida de depósitos amieloides en el tejido cerebral, originando déficits cognitivos de diverso grado ([Colie et al 2017](#), [Cho et al 2014](#), [Kimura & Ohno 2009](#)). Estos ratones, generosamente cedidos por la Dra. Milagros Ramos (Centro de Tecnología Biomédica, Universidad Politécnica de Madrid), sobreexpresan la proteína humana precursora del amiloide (APP) triplemente mutada y la presenilina 1 (PS1) doblemente mutada. Las mutaciones presentes en sendas proteínas causan un marcado aumento en la producción del péptido β -amiloide (A β 42), originando placas que se depositan en el cerebro de los animales

incluyendo el estriado ([Cho et al 2014](#)), produciendo pérdida neuronal y entre otros deterioros cognitivos, déficits de la memoria espacial, que pueden ser detectados mediante este test ([Oakley et al 2006](#), [Wei et al 2016](#)). Al examinar los ratones 5XFAD (**Figura 4.5. B; barra gris**), se detectó un número reducido de entradas en los tres brazos de manera consecutiva (set/alternancias). A lo largo del tiempo de estudio, los animales inyectados con la solución salina (**barras blancas**) o implantados con el biomaterial (**barras negras**) no presentaron diferencias significativas respecto a sus valores basales (previo a la inyección), confirmando la ausencia de déficits de memoria espacial en estos ratones. Además, el número de entradas totales en los tres brazos fue similar en todos los animales (datos no mostrados), indicando niveles similares de actividad durante la ejecución del test.

Por otro lado, dos tests funcionales, el del cilindro y el de la rejilla, han sido previamente utilizados en modelos animales de daño cerebral para evaluar la coordinación sensorimotora de diferentes especies de roedores, incluidos rata y ratón ([Barrios et al 2016](#), [Clarkson et al 2013](#), [Hernandez & Schallert 1988](#), [Jin et al 2010a](#)). Con el test del cilindro (**Figura 4.5. C**) se evaluó la asimetría en el uso preferencial de las patas delanteras ([Jimenez-Martin et al 2015](#)) mientras que en el test de la rejilla se estudió la coordinación sensorimotora así como el aprendizaje motor ([Barrios et al 2016](#), [Wang et al 2017](#)).

Figura 4.5. Evaluación cognitiva y sensorimotora de animales implantados con hidrogel de fibroína. (A) Diseño experimental para estudiar el ciclo vigilia-sueño, las funciones cognitivas, sensoriales y motoras de animales inyectados con volúmenes equivalentes de PBS y fibroína. La evaluación cognitiva y sensorimotora se realizó mediante varios tests de comportamiento (laberinto en Y, test de la rejilla y del cilindro) que fueron aplicados antes (-72 horas) y durante las 4 semanas posteriores a la inyección de fibroína en el estriado, momento a partir del cual se realizó el implante de electrodos para el registro de la actividad eléctrica cerebral (EEG) y el análisis del ciclo vigilia-sueño. (B) Evaluación de la memoria espacial mediante el test del laberinto en Y mostrando el porcentaje de alternancias a lo largo del tiempo tras la inyección de PBS (barras blancas) o fibroína (barras negras) respecto a los mismos animales antes de ser inyectados (barra rayada, situación basal). La eficacia del test para la detección de déficits en memoria espacial pudo ser demostrada en un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer (ratones 5XFAD, barra gris), con porcentajes de alternancia marcadamente reducidos. (C) Test del cilindro para evaluar la asimetría en el uso preferencial de las patas delanteras. Los valores positivos más elevados en el índice de lateralidad, indican el uso preferencial de la pata delantera contralateral al hemisferio no inyectado (pata no afectada). Las barras blancas y negras representan los valores de los animales inyectados con PBS y fibroína respectivamente. La barra rayada muestra el índice de lateralidad en la situación basal (pre-inyección). (D) Test de la rejilla para examinar la coordinación sensorimotora a lo largo del tiempo post-inyección. Ambas gráficas muestran el porcentaje de fallos cometidos con la pata delantera contralateral al hemisferio no inyectado (panel ii) e inyectado (panel i). Los datos se muestran como las media $\pm$ EEM de 2 experimentos independientes con un mínimo de 9-10 ratones por grupo y 8 animales por grupo control (ratones 5XFAD). Los asteriscos indican diferencias significativas de los distintos grupos con respecto a los valores basales (ANOVA de dos factores, seguido del test de Tukey y test de Student: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

En el test del cilindro, los animales inyectados con PBS (**barras blancas**) o trasplantados con la fibroína (**barras negras**), no presentaron valores de lateralidad significativos respecto a su situación basal, previa a la inyección (**barra rayada**). Sin embargo, en el test de la rejilla (**Figura 4.5. D**), que presenta una fuerte sensibilidad para evaluar la coordinación sensorimotora ([Barrios et al 2016](#)), ambos grupos de animales (PBS o fibroína) mostraron un elevado porcentaje de fallos con la pata delantera contralateral al hemisferio inyectado a las 72 horas post-trasplante (**panel i**) y con respecto a su situación basal. Transcurridas las primeras 72 horas, los déficits detectados fueron reduciéndose progresivamente, alcanzando incluso valores por debajo de los obtenidos en la situación basal. Por el contrario, el porcentaje de fallos con la pata delantera contralateral al hemisferio no inyectado fue muy reducido (**panel ii**) y similar en ambos grupos de animales, y nuevamente se produjo una gradual reducción de los fallos por debajo de los valores basales a lo largo de las semanas tras la inyección. En ambas patas, la reducción progresiva en el número de fallos con respecto a los valores detectados en la situación basal, sugiere la existencia de aprendizaje motor conservado en ambos grupos de animales, independientemente de si fueron inyectados con PBS o fibroína. Por otro lado, cabe destacar que los déficits sensorimotrices se produjeron exclusivamente en las primeras 72 horas tras el implante, coincidiendo con la mayor respuesta inflamatoria y de muerte celular.

Al finalizar los estudios de comportamiento (4 semanas post-inyección), se implantaron electrodos de registro en la corteza para examinar la actividad eléctrica cerebral (**Figura 4.6.**). Además se implantaron electrodos en los músculos de la nuca para evaluar el tono y la contracción activa muscular. El análisis del electroencefalograma (EEG) y electromiograma (EMG) nos permitió estudiar los distintos estados conductuales (ciclos vigilia-sueño), que podrían verse modificados por un posible daño en la funcionalidad del estriado, como consecuencia del implante de la fibroína ([Baumann et al 2006](#), [Fisher et al 2013](#), [Vorobyov et al 2003](#)).

El análisis de la potencia en cada banda de frecuencia (EEG) y la actividad muscular (EMG) nos permitió asignar las diferentes épocas de registro a los distintos estados conductuales. En concreto, la vigilia caracterizada por una elevada amplitud de la señal de EMG, el sueño de ondas lentas (SWS) caracterizado por una baja potencia en el EMG y una señal elevada en la banda delta (1-4 Hz) y el sueño con movimientos oculares rápidos o sueño REM con baja actividad en el EMG y potencia elevada en la banda theta (4.5-8.5 Hz) (**Figura 4.6. A**). Al examinar la duración de las distintas fases del sueño a lo largo de todo un ciclo circadiano (24 horas de registro), no se encontraron diferencias relevantes en los porcentajes de tiempo invertidos en cada una de las tres fases estudiadas; vigilia, sueño SWS y REM (**Figura 4.6. B**) entre los distintos grupos de animales (no inyectados: **barras grises**; inyectados con PBS: **barras blancas**; trasplantados con SF: **barras negras**). Complementariamente examinamos la distribución de la potencia de la señal EEG dependiente del estado conductual, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos estudiados (PBS: **trazado azul**; SF: **trazado negro**; no inyectados: **trazado rojo**). Por tanto, la presencia de fibroína en el estriado no produjo modificaciones importantes en el patrón de

vigilia-sueño y tampoco se hallaron alteraciones relevantes de la actividad eléctrica cerebral, en el marco exploratorio realizado.

Figura 4.6. Exploración del ciclo vigilia-sueño en animales implantados con fibroína. (A) Ejemplos representativos de las señales registradas de electroencefalograma (EEG) y electromiograma (EMG) en los diferentes estados conductuales de sueño y vigilia. En la figura se muestran épocas de 10 segundos de duración. La actividad muscular se correspondió con una elevada amplitud de señal en el EMG durante la fase de vigilia, que pudo combinarse con una actividad irregular de baja amplitud en el EEG (vigilia tranquila) o con un ritmo regular en ondas theta (vigilia activa). Por el contrario, una menor actividad en el EMG se correspondió con las fases del sueño SWS (sueño de ondas lentas) y REM (sueño con movimiento ocular rápido). Durante la fase SWS la actividad de EEG se correspondió con una elevada potencia en la banda delta (1-4 Hz), mientras que elevadas amplitudes en el ritmo theta (4.5-8.5 Hz) fueron características del sueño REM. (B) Porcentaje de tiempo empleado en cada estado conductual durante un ciclo circadiano completo (24 horas de registro) en los animales inyectados con PBS (barras blancas), con fibroína (barras negras), o no inyectados (barra gris, control). (C) Densidad de potencia espectral en los diferentes estados conductuales (vigilia, SWS y sueño REM) correspondientes a los ratones inyectados con PBS (azul), fibroína (negro) o no inyectados (rojo, control). Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 2 experimentos independientes, con un mínimo de 9-10 ratones por grupo (PBS y fibroína) y 8 ratones en el grupo control (ANOVA de dos factores, seguido del test de Tukey y/o test de Scheffe).

En estudios previos se ha sugerido que el estriado modula la transmisión somatosensorial. Esto podría explicar porque en las primeras etapas de la enfermedad de Huntington, donde hay cambios degenerativos exclusivamente en el núcleo caudado, los pacientes muestren alteraciones en los potenciales evocados somatosensoriales ([de Tommaso et al 2016](#)). De hecho, en un modelo de la enfermedad de Huntington en el que se causó una lesión en el estriado de la rata tras la inyección de ácido quinolinico, se produjo una reducción considerable de los potenciales evocados somatosensoriales ([Schwarz et al 1992](#)). Por tanto, una consecuencia lógica derivada de estas evidencias sería que el biomaterial pudiera afectar la transmisión somatosensorial en el caso de originar un daño en el estriado una vez trasplantado. Por ello, se examinó la actividad de la corteza somatosensorial primaria del campo representativo correspondiente a las patas delanteras (S₁FL), mediante el registro de potenciales evocados somatosensoriales (PESS) (**Figura 4.7 A**).

Complementariamente, en este nuevo set de experimentos, examinamos primeramente la coordinación sensorimotora de los animales trasplantados empleando el test de la rejilla (**Figura 4.8 E**). De acuerdo a nuestros resultados previos (**Figura 4.5**), en este nuevo conjunto de animales tampoco se encontraron déficits sensorimotores de relevancia en ninguno de los dos grupos estudiados (PBS o fibroína) a las 4 semanas post-inyección. Posteriormente, en estos animales se implantaron electrodos corticales de registro para examinar la actividad cortical provocada en S₁FL.

El registro de los potenciales de campo provocados se realizó en ambos hemisferios y en respuesta a un estímulo eléctrico contralateral (**Figura 4.7**) e ipsilateral (**Figura 4.8**) de las extremidades delanteras. La estimulación del nervio mediano de las patas delanteras, produjo una respuesta en forma de onda (negativa-positiva; N1-P1), como resultado de la activación secuencial de varios circuitos corticales ([Jellema et al 2004](#)) que se identifican en tres fases. En la primera de ellas, las aferencias talámico-corticales despolarizan las células piramidales de las capas III y V. En una segunda fase, las neuronas piramidales más superficiales se despolarizan a través de proyecciones cortico-corticales supragranulares, originando que en la última fase, a través de proyecciones axónicas de las células piramidales de la capa Vb, activen a las células piramidales supragranulares de la capa I y II, generándose así el pico N1 negativo de la onda (marcado con flechas en la **figura 4.7**). En respuesta a la estimulación contralateral no se encontraron diferencias en la amplitud y latencia del pico N1 registrado en los hemisferios no inyectado e inyectado entre ambos grupos de ratones, PBS o fibroína (**Figura 4.7** y **tabla 4.5**). Por otro lado, la estimulación ipsilateral produjo en ambos hemisferios una respuesta evocada de menor amplitud y mayor latencia que la contralateral (**Figura 4.8** y **tabla 4.5**), pero tampoco se observaron diferencias apreciables entre ambos grupos de animales, sugiriendo que la conectividad inter-hemisférica está funcionalmente conservada ([Gonchar et al 1995](#)). La amplitud máxima de activación y latencia contralateral e ipsilateral del pico N1 no difirió significativamente de los valores encontrados en ratones no inyectados (**Tabla 4.5**).

Figura 4.7. Exploración de los efectos del implante estriatal de fibroína sobre la actividad evocada en la corteza somatosensorial. (A) Esquema del diseño experimental para la evaluación de la funcionalidad de la corteza somatosensorial en animales inyectados con fibroína. Primeramente, la coordinación sensorimotora fue analizada mediante el test de la rejilla en condiciones basales y 4 semanas post-inyección, momento a partir del cual se implantaron electrodos en ambos hemisferios (inyectado y no inyectado) para el registro de los potenciales evocados en la corteza somatosensorial (PESS). (B & D) Ejemplos representativos de los PESS obtenidos tras la estimulación contralateral de las patas delanteras en los animales inyectados con PBS o fibroína. A la izquierda de cada registro (B o D) se muestra un dibujo esquemático para ilustrar la colocación de los electrodos en ambos hemisferios: inyectado (sombreado gris) y no inyectado con respecto a la estimulación eléctrica de la pata contralateral. (C & E) Valores de amplitud y latencia obtenidos del pico de máxima respuesta de potencial negativo (flechas en B y D). Las barras blancas y negras representan el grupo de animales inyectados con PBS y fibroína respectivamente. Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 2 experimentos independientes con 10 animales por grupo (PBS o fibroína) (Test de Student).

Figura 4.8. Exploración de los efectos del implante estriatal de fibroína sobre la conectividad interhemisférica entre regiones homólogas de la corteza somatosensorial. (A & C) Ejemplos representativos de los PESS obtenidos en respuesta a un estímulo ipsilateral de las patas delanteras en los animales inyectados con PBS o fibroína. A la izquierda de cada registro se muestra un dibujo esquemático ilustrando la localización de los electrodos en ambos hemisferios en relación a la estimulación eléctrica de la pata ipsilateral. (B) & (D) Valores de amplitud y latencia obtenidos del pico de máxima respuesta de potencial negativo (flechas en A y C) frente a un estímulo ipsilateral en los animales inyectados con PBS (barras blancas) o fibroína (barras negras). (E) Evaluación de la coordinación sensorimotora mediante el test de la rejilla en condiciones basales (antes de ser inyectados; barras rayadas) y 4 semanas post-inyección en animales inyectados con PBS (barras blancas) o con fibroína (barras negras). En todo caso, el test de la rejilla se aplicó de forma previa a la realización de los PESS contra- e ipsilaterales. Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 2 ensayos independientes con 10 animales por grupo (Test de Student).

Tabla 4.5. Valores de amplitud y latencia de la activación máxima (pico N1), en respuesta a un estímulo contralateral e ipsilateral en ambos hemisferios, en ratones no inyectados e inyectados con PBS o fibroína.

		Estimulación contralateral		Estimulación ipsilateral	
		Amplitud (μ V)	Latencia (ms)	Amplitud (μ V)	Latencia (ms)
Hemisferio derecho (inyectado)	No inyectado	46,21 $\pm$ 7,54	19,17 $\pm$ 3,12	25,16 $\pm$ 4,26	31,86 $\pm$ 2,68
	PBS	31,16 $\pm$ 3,52	20,58 $\pm$ 1,81	22,57 $\pm$ 2,13	31,40 $\pm$ 1,28
	SF	38,88 $\pm$ 4,07	23,02 $\pm$ 2,02	20,19 $\pm$ 3,34	32,42 $\pm$ 1,29
Hemisferio izquierdo (no inyectado)	No inyectado	57,81 $\pm$ 9,23	21,59 $\pm$ 4,61	30,67 $\pm$ 6,84	32,61 $\pm$ 3,84
	PBS	36,83 $\pm$ 3,06	19,46 $\pm$ 1,02	22,21 $\pm$ 3,01	34,61 $\pm$ 1,26
	SF	44,12 $\pm$ 4,55	17,94 $\pm$ 0,73	27,96 $\pm$ 5,42	33,38 $\pm$ 1,12

Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 2 experimentos independientes con 10 animales por grupo (PBS o fibroína), y 6 animales no inyectados.

En conjunto, los resultados obtenidos durante el desarrollo de este primer objetivo, sugieren que el implante intracerebral de la fibroína en el estriado de los animales no indujo alteraciones de la coordinación sensorimotora, ni cambios en el aprendizaje motor, la memoria espacial, el ciclo vigilia-sueño o la transmisión somatosensorial. A nivel tisular, se produjo una respuesta inflamatoria y de muerte celular en las primeras 72 horas post-implante, sin mayor relevancia a tiempos posteriores. Las alteraciones observadas en estas primeras 72 horas parecen tener su correlato con una mayor disfunción sensorimotora que pudo ser detectada con el test de la rejilla, siendo muy similar en ambos grupos de ratones, PBS o fibroína, y estando probablemente relacionada con el procedimiento quirúrgico de inyección de la solución de fibroína o del PBS.

Tras 4-6 semanas después de la inyección intra-estriatal, las causas que subyacen a la preservación funcional del ciclo vigilia-sueño y a la normal transmisión somatosensorial no parecen estar relacionadas con la completa desaparición (degradación) del biomaterial en el estriado, puesto que a la finalización de los estudios electrofisiológicos se confirmó la existencia de depósitos del biomaterial en esta región (**Figura 4.9**). Más bien, es la falta de interacción biológica del biomaterial con el estriado la responsable de la ausencia de déficits funcionales en este intervalo temporal, que conceptualmente proporciona una prueba inequívoca de la tolerabilidad e inocuidad del biomaterial con el tejido cerebral.

Figura 4.9. Identificación de depósitos de fibroína en animales estudiados electrofisiológicamente. Imágenes representativas de cortes coronales de cerebro teñidos con Nissl correspondientes a dos animales distintos que fueron utilizados para los estudios de ciclo vigilia-sueño (A) y dos animales representativos de los estudios con potenciales evocados somatosensoriales (B). Noté en los cuatro animales, la existencia de depósitos de fibroína de diferente tamaño y variable localización en el estriado de los animales (flechas) a tiempos mayores de 6 semanas post-implante.

4.2. Evaluación de la compatibilidad biológica entre la fibroína de la seda y las células madre y progenitores de origen mesenquimal. Estudios de integración celular con el biomaterial.

Una vez confirmado que los hidrogeles de fibroína la seda (SF) podían ser implantados en el estriado de los animales sin producir alteraciones sensorimotoras ni cognitivas de relevancia, nuestro siguiente objetivo fue estudiar la compatibilidad del biomaterial con una población celular concreta procedente de la médula ósea del ratón, constituida por células madre y progenitores de origen mesenquimal (MSC/P). Entre las razones que justificaron el uso de esta población celular destacan en primer lugar el uso extendido de las MSC/P en modelos animales de daño cerebral, en los que identificaron las propiedades neuroprotectoras, neuroreparadoras e inmunomoduladoras de los precursores de origen mesenquimal ([Horie et al 2011](#), [Ishizaka et al 2013](#), [Mead et al 2014](#), [Scheibe et al 2012](#), [Shinozuka et al 2013](#)). Además, en los estudios realizados con pacientes, se ha demostrado la viabilidad y seguridad de las MSC/P cuando son administradas por ruta sistémica o implantadas intracerebralmente ([Kondziolka et al 2005](#), [Prasad et al 2012](#), [Prasad et al 2014b](#), [Savitz et al 2005](#), [Steinberg et al 2016b](#), [Suarez-Monteagudo et al 2009](#)). Aun cuando el número de ensayos clínicos y sujetos trasplantados es aún insuficiente para valorar adecuadamente la efectividad de este tipo concreto de terapia ([Hess et al 2017](#), [Kondziolka et al 2005](#), [Savitz et al 2005](#), [Steinberg et al 2016b](#), [Suarez-Monteagudo et al 2009](#)), el uso de tecnologías basadas en MSC/P como tratamiento terapéutico constituye un campo muy prometedor para posibilitar su utilización futura en la práctica médica.

Figura 4.10. Esquema experimental para estudiar la compatibilidad entre la fibroína y las células madre y progenitores de origen mesenquimal (MSC/P). Las MSC/P se extrajeron a partir de la médula ósea de ratones y posteriormente se expandieron ex vivo durante varias semanas en medio condicionado con EGF y PDGF. Primeramente se exploró la interacción de las MSC/P in vitro, analizando la supervivencia, retención, proliferación, adhesión y capacidad multipotente de estas poblaciones celulares en contacto con varios formatos de fibroína ("films" e hidrogeles). En una segunda fase se realizó el trasplante estriatal (caudado-putamen) de las MSC/P integradas en geles de fibroína y se estudió su supervivencia y retención a lo largo de varias semanas post-implante. El esquema gráfico (basado en el atlas estereotático de Paxinos y Franklin ([Paxinos & Franklin 2004](#))) muestra la localización estereotática elegida para realizar el implante (Antero-posterior:-1 mm; Lateral:+2,7 mm; Profundidad:+2,3 mm) en relación con la corteza cerebral, ambos ventrículos laterales y el hipocampo.

Por todo ello, durante el desarrollo de este objetivo se realizaron un conjunto de estudios para examinar tanto *in vitro* como *in vivo*, la supervivencia, proliferación y adhesión de las MSC/P en presencia del biomaterial, además de su retención y distribución una vez integradas en el hidrogel de fibroína. La **Figura 4.10.** muestra un esquema del diseño experimental propuesto. En primer lugar se realizó la extracción, purificación y caracterización de las MSC/P obtenidas a partir de médula ósea fresca y se estudió la interacción de esta población celular sobre distintos formatos de fibroína (“*films*” e hidrogeles). En una segunda fase se examinó la viabilidad del implante intracerebral de las MSC/P integradas con el biomaterial (SF-MSc).

4.2.1. Enriquecimiento, expansión y caracterización de cultivos primarios de MSC/P procedentes médula ósea.

Las MSC/P pueden ser encontradas en distintos tejidos y órganos, aunque originariamente se identificaron en la médula ósea ([Friedenstein et al 1974a](#)). Friedenstein y colaboradores ([Friedenstein et al 1974b](#), [Friedenstein et al 1976](#)) fueron los primeros en identificar las células madre mesenquimales contenidas en la médula ósea y observaron que poseían una morfología fibroblástica y que podían ser aisladas en base a su fuerte capacidad de adherencia celular al plástico de cultivo. También se observó que crecían formando unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) ([Friedenstein et al 1970](#), [Wexler et al 2003](#)). En 2006, la ISCT (“International Society for Cellular Therapy”) propuso 3 criterios que definen a las células madre de origen mesenquimal: 1) deben ser adherentes en cultivo; 2) expresar los marcadores de diferenciación Sca-1, CD29, CD44, CD105, y no expresar marcadores típicos de linaje hematopoyético como CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a o CD19; 3) tener capacidad para autorenovarse y diferenciarse a linajes mesenquimales (osteoblastos, adipocitos y condrocitos) bajo condiciones estándar de cultivo ([Dominici et al 2006](#)). Una característica inmunofenotípica adicional es que expresan Nestina, una proteína constituyente de los filamentos intermedios ([Mendez-Ferrer et al 2010](#)).

Antes de proceder a la purificación y expansión de los cultivos de MSC/P para los estudios de interacción con el biomaterial, primeramente se examinó la capacidad de las MSC/P presentes en médula ósea para diferenciarse a linajes mesenquimales. Las células extraídas de los huesos planos del ratón (tibia, fémur y cresta iliaca de la pelvis) conteniendo células hematopoyéticas y no hematopoyéticas (mesenquimales, estromales, reticulares, endoteliales) fueron cultivadas en diferentes medios condicionados. Tras varias semanas en cultivo se observó que las poblaciones celulares presentes en la médula ósea tenían la capacidad para formar unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F), osteoblastos (CFU-Ob), adipocitos (CFU-Ad) y condrocitos (CFU-Od), (**Figura 4.11. A**). La detección de CFU-F es considerada una prueba irrefutable de la presencia de células madre mesenquimales en cultivo ([Mendez-Ferrer et al 2010](#)).

Figura 4.11. Identificación inmunofenotípica y funcional de células madre y progenitores de origen mesenquimal derivados de médula ósea. (A) Capacidad multipotente de las poblaciones de MSC/P contenidas en médula ósea. De izquierda a derecha, se muestran imágenes representativas de colonias de fibroblastos (CFU-F), osteoblastos (CFU-Ob), adipocitos (CFU-Ad) y condrocitos (CFU-Cd) obtenidas tras la incubación en medio condicionado de las poblaciones celulares presentes en médula ósea. (B) Ventanas de adquisición y estrategia de separación y enriquecimiento ("sorting") de MSC/P mediante citometría de flujo. La población de MSC/P representa un 1-2% del total de médula ósea, y puede ser identificada y purificada mediante selección negativa para los marcadores CD45 (linaje leucocitario), CD31 (linaje endotelial) y Ter119 (linaje eritroide). (C) Capacidad multipotente de poblaciones celulares $CD45^{Neg}/CD31^{Neg}/Ter119^{Neg}$ purificadas de médula ósea. De izquierda a derecha se muestran imágenes representativas de CFU-F, CFU-Ob, CFU-Ad y CFU-Cd.

También se obtuvieron los distintos tipos de CFU (**Figure 4.11. C**) a partir de poblaciones enriquecidas de MSC/P procedentes de médula ósea fresca tras separación magnética negativa ([Morikawa et al 2009](#)) para los marcadores CD45, CD31 y Ter119 (**Figura 4.11. B**), que son típicamente expresados por poblaciones de leucocitos, células endoteliales y eritrocitos respectivamente. De hecho, un criterio adicional para la identificación inmunofenotípica de MSC/P se basa en su falta de expresión de marcadores hematopoyéticos y endoteliales. La población de células CD45^{Neg}, CD31^{Neg} y Ter119^{Neg} representa un porcentaje muy bajo (~ 1%) sobre el total de las células presentes en médula ósea (**Figura 4.11. B**), pero es en este pequeño porcentaje donde reside la mayor parte de las MSC/P con capacidad multipotente, ya que la población de células CD45^{Pos}, CD31^{Pos} y Ter119^{Pos} (~ 99 %) no contienen MSC/P y no formaron CFU de fibroblastos, osteoblastos, adipocitos ni condrocitos en los mismos medios de cultivo condicionados (datos no mostrados). Para los estudios de interacción biológica de las MSC/P con el biomaterial era necesario utilizar un cultivo celular de fácil manejo, con alto contenido de MSC/P y con tasas de crecimiento celular razonables para los ensayos de interacción que se pretendían realizar. Dado que el contenido de MSC/P en médula ósea fresca es muy reducido, realizamos la expansión *ex_vivo* de esta población celular en medio condicionado. El enriquecimiento de este fenotipo celular puede realizarse empleando distintas técnicas como son los gradientes de percoll ([Rosca & Burlacu 2010](#)), separación celular mediante anticuerpos ([Liu et al 2015](#)), o metodologías basadas en la gran capacidad de adhesión de las MSC/P sobre distintos materiales ([Li et al 2016b](#), [Zhu et al 2010](#)), en nuestro caso, éste último fue el método seleccionado.

Figura 4.12. Enriquecimiento y expansión *ex-vivo* de MSC/P derivadas de médula ósea. (A) Imágenes representativas de poblaciones celulares de médula ósea en medio condicionado para favorecer la expansión de MSC/P. Se muestran imágenes a distintos aumentos (100X y 200X en las imágenes superiores e inferiores respectivamente) y a diferentes pases en cultivo desde la extracción de la médula ósea y posterior sembrado en placa de cultivo (pase 0).

Las células de la médula ósea se cultivaron en condiciones estándar en combinación con varios factores de crecimiento (*ver sección materiales y métodos*). Tras varios días en cultivo (en torno a 5-10 días), se observó una población celular heterogénea con excelentes propiedades adherentes (**Figura 4.12., pase 0**). En sucesivos pases, se fueron eliminando del cultivo poblaciones celulares contaminantes con menor capacidad adherente (típicamente células endoteliales y macrófagos), observándose un enriquecimiento progresivo de células con morfología fibroblástica similar a las CFU-F (**Figura 4.12 pases 5-10**), que es característica de poblaciones celulares con alto contenido de MSC/P ([Friedenstein et al 1976](#)). En la citometría de flujo, cerca del 100% de las células expandidas en cultivo (análisis en pases 6-7) fueron CD31^{neg}, CD45^{neg} y Ter119^{neg}, carentes por tanto de otras poblaciones celulares contaminantes de la médula ósea (**Figura 4.13. A**). Complementariamente, los estudios funcionales mostraron que la población celular expandida *ex vivo* tiene capacidad multipotente y puede ser diferenciada a linajes mesenquimales: osteoblastos, adipocitos y condrocitos (**Figura 4.13. B**).

Figura 4.13. Caracterización inmunofenotípica y funcional de cultivos de MSC/P expandidos *ex vivo*. (A) Ventanas de adquisición representativas para confirmar mediante citometría de flujo la ausencia de los marcadores CD45, CD31 y Ter119 en las MSC/P expandidas *ex vivo* (pases 6-7). (B) Capacidad multipotente de las MSC/P para diferenciarse a linajes de osteoblastos (marcaje con fosfatasa alcalina, un marcador de diferenciación osteogénica), adipocitos (detección con aceite rojo para identificar vacuolas lipídicas) y condrocitos (detección de proteoglicanos mediante azul de toluidina) en medio condicionado. Se muestran imágenes a distintos aumentos (100X y 200X en las imágenes superiores e inferiores respectivamente).

Por tanto, la población celular expandida *ex vivo* está altamente enriquecida con MSC/P y tiene características inmunofenotípicas y funcionales (multipotencialidad) idénticas a las poblaciones de MSC/P presentes en médula ósea fresca (**Figura 4.11.**), un requisito que resultaba indispensable para garantizar la identidad de los cultivos celulares que se utilizarían en los ensayos posteriores *in vitro* e *in vivo*.

4.2.2. Estudios de interacción *in vitro* entre las MSC/P y la fibroína de la seda.

En una siguiente etapa se examinó la compatibilidad de las MSC/P expandidas *ex vivo* con diferentes formatos de fibroína (*films* e hidrogeles). El desarrollo de “films” fue necesario para obtener una prueba inicial de concepto sobre la viabilidad, proliferación y adhesión celular de las MSC/P en contacto con un formato de fibroína más simple de obtener, manipular y con una estructura y composición relativamente reproducibles respecto al proceso más elaborado de integración celular en los hidrogeles y los estudios posteriores de interacción biológica con las MSC/P.

4.2.2.1. Estudios sobre “films” de fibroína.

Los “films” de fibroína fueron generados a partir de la solubilización de la proteína liofilizada a diferentes concentraciones (2%, 4%, 6% y 8%) en H₂O o en PBS (HFIP). Sobre los pocillos de cultivo, los “films” resultantes presentaron un mayor grado de uniformidad cuando la fibroína se disolvió en HFIP (**Figura 4.14**). En base a su uniformidad, se consideró que los “films” generados con un 6% de fibroína (p/v) solubilizado en HFIP podrían resultar adecuados para los estudios de interacción con las MSC/P.

Figura 4.14. Obtención e identificación de la fibroína en formato “film”. Fotografías de “films” de fibroína en placas de cultivo (24 - pocillos) obtenidos por solubilización en H₂O (A) o en hexafluoro-2-propanol (B), tras la tinción con azul de toluidina. En (A) y (B) se muestran “films” obtenidos a distinta concentración de fibroína (p/v) con volúmenes de solubilización de 100 µl (imágenes superiores) o 200 µl (imágenes inferiores). Nótese como la solubilización de la fibroína en hexafluoro-2-propanol (B) permite obtener “films” de mayor consistencia y uniformidad en la totalidad del área del pocillo.

En primer lugar ensayamos la capacidad proliferativa de las MSC/P en contacto con la fibroína, en condiciones estándar de cultivo. Las imágenes obtenidas (**Figura 4.15. A**), muestran como las MSC/P mantuvieron su morfología fibroblástica característica cuando crecieron en plástico (**panel i**) o sobre “films” de fibroína (**panel ii**). Con ambos materiales se llegó a un estado de confluencia máxima, aproximadamente tras dos semanas en cultivo en las condiciones ensayadas. Cuando analizamos la tasa de expansión celular (**Figura 4.15. B; círculos negros**), no encontramos diferencias entre ambas condiciones, siendo el tiempo de duplicación celular (*tiempo de duplicación* = $(\text{tiempo} * \log_2) / (\log^{\text{concentración final}} - \log^{\text{concentración inicial}})$) de 2.30 y 2.54 días en plástico (**círculos blancos**) y fibroína (**círculos negros**) respectivamente. Aunque no se hallaron diferencias en la tasa de expansión celular, se analizó en detalle las distintas fases del ciclo celular.

Figura 4.15. Estudios de proliferación de MSC/P sobre “films” de fibroína. (A) Imágenes representativas de poblaciones de MSC/P sobre plástico (panel i) o “films” de fibroína (panel ii) a distintos tiempos de cultivo. (B) Tasa de expansión de MSC/P sobre plástico (círculos blancos) o fibroína (círculos negros) a lo largo 12 días de cultivo. En cada punto temporal la tasa de expansión celular se calculó considerando el número de células inicialmente sembradas (5000 células; tiempo cero). Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes, con 9 mediciones por grupo (plástico o fibroína) y punto temporal.

El ciclo celular se compone de varias fases y cada una de ellas regula diferentes estados celulares, incluyendo la quiescencia y la entrada de la célula en mitosis (**Figura 4.16. A**) La posibles alteraciones en el ciclo celular se estudiaron por citometría de flujo empleando la molécula fluorescente 7-aminoactinomicina D (7-ADD) (**Figura 4.16. B**), siendo la fluorescencia emitida por la 7-ADD proporcional a la cantidad de material genético presente en las células. La cuantificación del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular ((**Figura 4.16. C y D**) reveló que desde el estado de quiescencia inducida en los cultivos (G_0G_1 ; día 0), independientemente de la incubación sobre plástico (**barras blancas**) o fibroína (**barras negras**), se produjo un aumento similar del porcentaje de células en fase de síntesis (S) y división celular (G_2M) a lo largo del tiempo de cultivo, llegando a su confluencia máxima los días 9 y 11, lo que se correlacionó con una disminución en el porcentaje de células en división (fase S y G_2M), aumentando en paralelo el porcentaje de células en fase G_0G_1 .

En conjunto, los resultados de proliferación y ciclo celular indicaron que durante periodos cortos de exposición (12 días), la fibroína no indujo efectos adversos sobre la población de MSC/P, permitiendo la expansión de esta población celular en contacto con el biomaterial.

El estudio de la proliferación celular constituyó una medida indirecta de la viabilidad celular de las MSC/P en contacto con el biomaterial. Dado que desconocíamos si la incubación de la fibroína con las MSC/P podría producir toxicidad celular a largo plazo, realizamos una serie de experimentos destinados a tal fin. Para ello suplementamos los cultivos de MSC/P con Mitomicina C, un agente anti-tumoral con elevada afinidad por el ADN nuclear, que impide la duplicación del material genético inhibiendo de este modo la proliferación celular ([Cheng et al 2016](#)). Esta estrategia permitió mantener los cultivos celulares en un estado de quiescencia prolongada. En estos estudios, no encontramos diferencias marcadas en la morfología de las MSC/P en contacto con plástico o fibroína más allá de 7 semanas desde el sembrado de las células (**Figura 4.17. B**), y el porcentaje de mortalidad acumulada a lo largo del tiempo de cultivo fue similar en ambos grupos (**Figura 4.17. C**).

Figura 4.16. Estudios del ciclo celular en MSC/P sobre “films” de fibroína. (A) Dibujo esquemático para ilustrar las distintas fases del ciclo celular. Desde un estado quiescente G₀, las células entran en la fase G₁ para dar comienzo a las distintas etapas de la mitosis. Durante G₁, se sintetiza ARN mensajero y proteínas. La fase G₁ termina con el comienzo de la fase de síntesis del ADN (S), continuando con la síntesis de proteínas y crecimiento celular (G₂), y finalizando con la división celular (M), en la que se reparte el material genético y el citoplasma en 2 células hijas. Las distintas fases del ciclo celular pueden ser identificadas mediante técnicas de citometría de flujo por la intensidad de fluorescencia a la 7-Amino actinomicina-D (7-ADD) que presenta alta afinidad por el ADN y se intercala fuertemente entre las bases de guanina/citosina del ADN de doble cadena. Las fases G₀G₁ se caracterizan por una intensidad de fluorescencia menor (carga genética 2n) que la fase S, donde la intensidad de fluorescencia va siendo progresivamente mayor a medida que aumenta el contenido de ADN y se produce una mayor incorporación de 7-ADD; y finalmente las fases G₂M presentan la mayor intensidad de fluorescencia (carga genética 4n). (B) Estrategia experimental para la identificación por citometría de flujo del porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular: (i) La población de MSC/P se identificó por su tamaño y complejidad celular; (ii) Se relacionó el área y la anchura del pulso de voltaje celular para cada evento fluorescente a la 7-ADD discriminando de este modo los eventos de células simples de las células pareadas y agregaciones multicelulares (“clumps”); (iii) Finalmente se cuantificaron y adscribieron los eventos simples a las diferentes intensidades de fluorescencia. (C) Histogramas representativos de fluorescencia a la 7-ADD en cultivos de MSC/P sobre plástico o fibroína a diferentes días de cultivo. (D) Cuantificación del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en cultivo sobre plástico (barras blancas) o fibroína (barras negras), a lo largo del tiempo del tiempo de estudio. Nótese el elevado porcentaje de células en G₀/G₁ tanto al comienzo del cultivo tras la sincronización celular (tiempo cero), como cuando la confluencia celular alcanzó valores elevados (día 11) produciéndose inhibición del crecimiento por contacto celular. Los resultados se muestran como la media ± EEM de 3 experimentos independientes, con 9 mediciones por grupo (plástico o fibroína) y punto temporal.

Figura 4.17. Estudios de viabilidad de MSC/P sobre “films” de fibroína. (A) Estrategia experimental para la identificación por citometría de flujo del porcentaje de células muertas en cultivos sobre plástico o fibroína. Las células necróticas y apoptóticas tardías fueron identificadas en base a su mayor nivel de fluorescencia para el ioduro de propidio (IP) respecto a un control de viabilidad celular (células crecidas 24 horas sobre plástico de cultivo). La estrategia experimental planteada (marcaje con IP) pudo ser corroborada en cultivos de MSC/P incubadas con Dimetilsulfóxido (DMSO), que fueron empleados como control positivo de mortalidad celular. (B) Imágenes representativas de MSC/P sobre plástico o fibroína tras 7 semanas en cultivo. El estudio de la mortalidad celular se realizó en condiciones de arresto celular con mitomicina C para reducir el metabolismo y mantener los cultivos en el mismo pocillo durante varias semanas. (C) Se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada de MSC/P sobre plástico (círculos blancos) o fibroína (círculos negros) a lo largo del tiempo de cultivo. Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes, con 9 mediciones por grupo y punto temporal.

Nuestros resultados indican que las MSC/P pueden crecer sobre “films” de fibroína sin efectos tóxicos de consideración achacables al biomaterial. La ausencia de toxicidad no pudo ser debida a una degradación progresiva del biomaterial a lo largo del tiempo de cultivo, puesto que de forma rutinaria se confirmó, mediante tinción con azul de toluidina, tanto la presencia de los “films” de fibroína como su uniformidad y extensión en la totalidad del área del pocillo de cultivo tras finalizar cada ensayo (datos no mostrados).

Otro aspecto importante de nuestro estudio, fue el análisis de la adherencia de las MSC/P a la fibroína, puesto que la adhesión celular es fundamental para una gran variedad de procesos celulares, incluyendo entre otros la proliferación, la diferenciación o la inflamación celular ([Brunner et al 2011](#), [Diez-Tejedor et al 2001](#), [Du et al 2016](#), [Fournier et al 2005](#)). Minjuan Wu y col, describieron como la molécula de adhesión celular independiente de Ca^{+2} , JAM-A, promueve la migración y diferenciación de las MSC/P en la zona de daño, demostrando además que mejora la secreción de factores tróficos, favoreciendo la angiogénesis y el proceso de cicatrización en respuesta al daño tisular ([Wu et al 2014](#), [Wu et al 2015a](#)).

Primeramente examinamos el curso temporal de adhesión de las MSC/P sobre “films” de fibroína en comparación con otras proteínas de matriz extracelular, como la fibronectina y la laminina, que expresan motivos de unión a receptores de integrinas de superficie, favoreciendo la adherencia celular ([Goodwin & Pauli 1995](#), [Liu et al 2008a](#)). Tras 24 horas en cultivo, la mayor parte de las MSC/P inicialmente sembradas se encontraron adheridas a los distintos materiales ensayados (**Figura 4.18. A**), aunque en contacto con la fibroína presentaban una morfología esferoide con aparentemente menos procesos celulares (extensiones citoplasmáticas), que sin embargo resultaron compatibles con una proliferación normal en días posteriores (**Figura 4.15 y 4.16**).

El análisis del curso temporal de adhesión celular indica que las MSC/P tardaron mucho más tiempo en adherirse a la fibroína y a la laminina que a la fibronectina o al plástico (**Figura 4.18 B**). Tan sólo 2 horas después del sembrado de las células, el 50% de las MSC/P se encontraron adheridas a la fibronectina o al plástico, a diferencia de lo que sucedió sobre el resto de materiales. Transcurridas 12 horas en cultivo, únicamente las células sembradas sobre plástico o fibronectina se encontraron adheridas en su totalidad, indicando que la adherencia se produce de manera diferencial sobre los distintos biomateriales.

Figura 4.18. Cambios en la cinética de adhesión celular de las MSC/P sobre "Films" de fibroína. (A) Imágenes representativas de las MSC/P adheridas sobre fibroína, fibronectina y laminina 24 horas después del sembrado celular. Las células en contacto con la fibroína mostraron una morfología esferoide caracterizada por un reducido número de procesos (extensiones citoplasmáticas) en comparación con las mismas células adheridas sobre fibronectina, laminina o plástico tratado. (B) Cuantificación del porcentaje de MSC/P adheridas en función del tiempo de sembrado sobre fibroína (círculos negros), plástico (círculos blancos), fibronectina (triángulos blancos) y laminina (cuadrados blancos). Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes y 9 mediciones por grupo y punto temporal. Los asteriscos indican diferencias significativas en el porcentaje de células adheridas entre distintos materiales para un mismo punto temporal (ANOVA de dos factores, seguido del test de Tukey; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

El curso temporal de adhesión, no nos proporcionó información sobre la intensidad de unión (adhesión firme) de las MSC/P sobre la fibroína. Alteraciones en la fuerza de adherencia de las MSCs a la fibroína, podrían sugerir déficits de adhesión, achacables a la ausencia de motivos de adhesión celular en la fibroína, a diferencia de la laminina y la fibronectina que presentan péptidos de unión a integrinas celulares ([Pierschbacher & Ruoslahti 1984](#), [Tseng & Mortensen 1989](#)). Para ello, se desarrolló un paradigma experimental basado en ensayos de centrifugación invertida, capaz de cuantificar la intensidad de adhesión de las MSC/P (**Figura 4.19. A**). Además de la fibroína, laminina y fibronectina, en el estudio se utilizó vidrio como control de baja adherencia, puesto que este último material carece de motivos de adhesión celular. Tras 48 horas en cultivo, las células mostraron morfologías similares (tipo fibroblástico) en todos los grupos experimentales antes del inicio del ensayo (**Figura 4.19. B**), indicando que el aspecto esferoide (menos fibroblástico) de las MSC/P tras 24 horas de contacto con la fibroína detectada en el primer estudio de adhesión (**Figura 4.18. A**) fue meramente transitorio. Las MSC/P se sometieron a intensidades de centrifugación crecientes durante 5 minutos y se contabilizó el porcentaje de células que permanecieron adheridas a los distintos materiales (**Figura 4.19 B y C**). Los resultados indican que la adherencia de las MSC/P se produjo con mayor intensidad sobre fibronectina (**triángulos**

blancos) y lamina (cuadrados blancos) (proteínas de matriz extracelular), que sobre fibroína (círculos negros) o vidrio (círculos blancos).

Figura 4.19. Cambios en la adhesión firme de las MSC/P sobre “films” de fibroína. (A) Estrategia experimental para determinar la intensidad de adhesión firme de MSC/P sobre fibroína, fibronectina y laminina. En una primera etapa se recubrieron los cubreobjetos de vidrio con distintos materiales (fibroína, fibronectina o laminina), sembrándose a continuación una cantidad conocida de MSC/P (i: entrada). Tras 48 horas en cultivo, los cubreobjetos con las células adheridas se invirtieron sobre tubos eppendorf y fueron sometidos a fuerzas centrífugas relativas (Fcr) de intensidad variable a tiempo constante (5 minutos). Tras la centrifugación se contabilizaron las células que permanecieron adheridas a los diferentes biomateriales (ii: salida). (B) De izquierda a derecha se muestran imágenes representativas de cultivos celulares sobre los distintos materiales, antes (panel i; entrada) y después (panel ii; salida) de una centrifugación a 233 fcr (máxima fuerza de centrifugación aplicada en estos estudios). (C) Relación entre la fuerza centrífuga relativa (Fcr) y el porcentaje de células adheridas sobre vidrio (círculos blancos), fibroína (círculos negros), fibronectina (triángulos blancos) y laminina (cuadrados blancos) tras 5 min de centrifugación. Para mayor claridad, en las gráficas inferiores se muestra una ampliación de las gráficas superiores en los intervalos de centrifugación de 0-8 Fcr. Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 6 experimentos independientes, con 18 repeticiones por grupo y punto temporal. Los asteriscos indican diferencias significativas en el % de adhesión entre los distintos materiales para una misma intensidad de centrifugación (ANOVA de dos factores, seguido del test de *Tukey*; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Un último aspecto que resultó interesante explorar, fue si la capacidad multipotente de las MSC/P sobre films de fibroína podría estar comprometida. Sin embargo, las MSC/P pudieron diferenciarse hacia linajes osteoblásticos y adipocíticos tras 6 semanas en contacto con el biomaterial (**Figura 4.20.**), mientras que la diferenciación a linajes condrocíticos no pudo ser ensayada por la gran avidez de la fibroína por el marcador condrocítico (azul de toluidina), que produjo interferencias en nuestras condiciones experimentales.

En conjunto, los resultados obtenidos durante esta primera fase de estudio, sugieren que los “films” de fibroína no producen toxicidad sobre las MSC/P a lo largo de varias semanas en cultivo. Además, las MSC/P pueden proliferar sobre “films” de fibroína de forma similar a como lo hacen en el plástico de cultivo. Sin embargo, la adherencia celular de las MSC/P sobre fibroína resultó alterada en términos cinéticos y de intensidad. Aunque desconocemos el efecto que ésta limitada adhesión pudiera tener sobre aspectos funcionales de las MSC/P, no modificó su capacidad de diferenciación, avalando la tolerancia de este biomaterial para soportar el crecimiento, expansión y multipotencia de esta población celular.

Figura 4.20. Preservación de la capacidad multipotente de las MSC/P en contacto con “films” de fibroína. De izquierda a derecha se muestran imágenes representativas de osteoblastos y adipocitos obtenidos por incubación de las MSC/P en medio condicionado. Imágenes superiores (100X) e inferiores (200X).

4.2.2.2. Estudios *in Vitro* de integración de MSC/P en hidrogeles de fibroína.

Estudios previos han demostrado la viabilidad celular de poblaciones de origen mesenquimal y/o neural cultivadas en el interior de hidrogeles de fibroína ([Calabrese & Kaplan 2012](#), [Floren et al 2016](#), [Sun et al 2015b](#), [Sun et al 2016](#)), por lo que decidimos analizar la viabilidad y distribución de nuestra población de MSC/P tras integrarse en el interior de los hidrogeles de fibroína.

Tras la solubilización de la fibroína en PBS, se realizó la sonicación en la forma descrita en el primer objetivo, momento a partir del cual las células se mezclaron homogéneamente con el biomaterial, y se cultivaron añadiendo el medio condicionado apto para el crecimiento de las MSC/P. En estos estudios, tras un intervalo aproximado de 10-15 min el material gelificó completamente en todas las muestras analizadas. Para determinar la viabilidad de las células integradas en el biomaterial, se utilizó un derivado acetoximetilado de la calceína denominado calceína-AM. La calceína-AM es un compuesto no fluorescente que puede ser absorbido por las células vivas, donde es transformado por esterasas celulares a calceína, una molécula fuertemente fluorescente. De esta forma, pudimos detectar una marcada fluorescencia celular a lo largo de dos semanas de cultivo (**Figura 4.21. A**), indicando que las MSC/P sobreviven en el interior de los geles durante este periodo de tiempo analizado. No obstante, a diferencia de los estudios realizados con “*films*”, las MSC/P presentaron en los hidrogeles un aspecto esferoide no fibroblástico (**Figura 4.21. A**) que sugiere importantes cambios en su arquitectura celular denotando posiblemente fuertes anomalías en la adherencia celular.

Para cuantificar si las MSC/P podían proliferar y expandirse en el interior de los hidrogeles, se realizó un ensayo colorimétrico basado en la reducción de la sal amarilla de tetrazolio “XTT” a formazan de color naranja, que es soluble en agua, por la acción de la deshidrogenasa mitocondrial. En este ensayo, un incremento progresivo del número de células viables originaría una mayor actividad mitocondrial y un aumento proporcional del XTT reducido, que puede ser cuantificado mediante espectrofotometría con un pico máximo de absorción a 450 nm ([Scudiero et al 1988](#)). Aun cuando los resultados del ensayo de calceína indicaron que las MSC/P permanecieron viables en el interior de los geles, en el ensayo “XTT” no se observó una variación significativa de la absorbancia en el intervalo de 2 semanas de cultivo, indicando que las MSC/P integradas en los geles de fibroína tienen una actividad metabólica reducida compatible con la ausencia de proliferación celular (**Figura 4.21. B**). Por otro lado, la relativa estabilidad en los valores de absorbancia constituyó un indicio razonable de la elevada viabilidad de las MSC/P integradas en el biomaterial.

Figura 4.21 Estudios de supervivencia y expansión de MSC/P encapsuladas en hidrogeles de fibroína. (A) Imágenes representativas de MSC/P encapsuladas en hidrogeles de fibroína a 72 horas, 1 semana y 2 semanas de cultivo. Las MSC/P en el interior de los hidrogeles pudieron ser visualizadas tras su incubación con un colorante fluorescente de viabilidad celular (calceína). Las imágenes superiores e inferiores se corresponden con 100 y 400 aumentos respectivamente. Nótese en mayor detalle el aspecto esferoide y menos fibroblástico de las células integradas en el interior de los geles, denotando anomalías en la adherencia celular. (B) Curva de calibración (panel i) mostrando la relación de absorbancia a 450 nm del XTT y cantidades conocidas de MSC/P encapsuladas en hidrogeles de fibroína tras 4 horas de incubación. En el panel ii se muestra la determinación del contenido en XTT a distintos tiempos de cultivo tras la encapsulación inicial de 15.000 (círculos negros) y 30.000 (círculos grises) células respectivamente. Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes con 9 repeticiones por grupo y punto temporal.

Posteriormente se examinó la distribución y retención de las MSC/P en el interior de los geles de fibroína utilizando moldes de morfología cilíndrica (*ver sección materiales y métodos*). Para ello, los cilindros de fibroína con las células en su interior fueron incubados con calceína-AM. En secciones longitudinales del cilindro se estimó el número y distribución de las células fluorescentes positivas (**Figura 4.22. A**). Dos y cuatro semanas después de la encapsulación, el número de células calceína positivas fue similar entre las distintas secciones analizadas (**Figura 4.22.B**) indicando que la integración celular resultó homogénea durante el proceso de gelificación y que a lo largo del tiempo de cultivo analizado no existieron fenómenos de migración celular que podrían haber originado cierta asimetría en la distribución de las MSC/P. Por otro lado, de la ausencia de cambios significativos en el número total de células o células por sección entre 2 a 4 semanas de

cultivo, se puede inferir que las MSC/P permanecieron viables y retenidas en el interior de los geles sin capacidad de crecimiento alguno, éste último hallazgo en línea con los estudios de actividad metabólica utilizando XTT.

Figura 4.22 Estudios de retención y distribución celular de las MSC/P encapsuladas el interior de hidrogeles de fibroína. (A) Imágenes representativas tomadas de secciones longitudinales de moldes de fibroína con forma cilíndrica, mostrando la distribución de las MSC/P calceína positivas. Se muestran campos correspondientes a ambos extremos del molde y a la región central. (B) Cuantificación del número de células por rodaja de cilindro. Se analizaron un total de 12 rodajas por cada molde cilíndrico (dimensiones del molde cilíndrico: 8.55 mm de altura x 5 mm de diámetro, ~ 168 mm³ de volumen total), con ~ 14 mm³ de volumen por rodaja. En estos estudios se realizó una encapsulación inicial de 30.000 células por molde, estimando, tras dos y cuatro semanas en cultivo (símbolos negros y grises respectivamente), el contenido celular presente en cada rodaja. Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes, con 9 repeticiones por grupo y punto temporal.

4.2.3. Análisis *in vivo* de la supervivencia y retención de las MSC/P integradas en hidrogeles de fibroína.

La finalidad de este estudio fue conocer si el biomaterial podría favorecer la supervivencia y retención de las MSC/P en el parénquima cerebral intacto, ya que en una gran variedad de estudios el implante de células madre ha sido asociado con una pérdida severa de las células implantadas en el tejido huésped, que en general no pueden ser encontradas más allá de 1-3 semanas después del injerto cerebral ([Coyne et al 2007](#), [Coyne et al 2006](#), [Moloney et al 2010](#)). Para los estudios de localización ("*tracking*") celular *in vivo* empleamos MSC/P derivadas de ratones que expresaron la proteína fluorescente EGFP (pico emisión ~ 510 nm) de forma constitutiva bajo el promotor de la β -actina de pollo, generosamente donados por el Dr. Masaru Okabe (Universidad de Osaka, Japón), y el Dr. Jose Carlos Segovia (CIEMAT).

Primeramente se expandieron cultivos de MSC/P a partir de la médula ósea de ratones EGFP (Figura 4.23. A). La citometría de flujo confirmó que el 100% de las MSC/P-EGFP expresaban fluorescencia en el rango de emisión de la proteína EGFP, a diferencia de las MSC/P derivadas de ratones silvestres (Figura 4.23. B). Además, en función del número de pases el porcentaje de MSC/P fluorescentes fue cercano al 100 % (Figura 4.23. C), siendo la intensidad media fluorescente, relativamente elevada en los pases analizados (pase 3 a 7), que fueron los que se utilizaron en los estudios de implante intracerebral.

Figura 4.23 Expansión ex-vivo de MSC/P derivadas de médula ósea de ratones modificados que expresan la proteína fluorescente verde (EGFP). (A) Imágenes representativas de poblaciones celulares de médula ósea en medio condicionado para favorecer la expansión de MSC/P-EGFP. Se muestran imágenes (200X) de diferentes pases en cultivo desde la extracción de la médula ósea y posterior sembrado en placa de cultivo (pase 0). (B) Estrategia experimental utilizada para la identificación por citometría de flujo de la fluorescencia EGFP en MSC/P. Nótese la ausencia de fluorescencia en MSC/P derivadas de ratones silvestres (WT). (C) Cuantificación del porcentaje de células EGFP positivas (panel i) y de la intensidad media fluorescente (IMF; panel ii) en función del número de pases de cultivo (panel ii) en MSC/P derivadas de ratones EGFP y WT respectivamente.

Figura 4.24. Estudios de retención y supervivencia de MSC/P-EGFP implantadas estriatalmente en ratones. Imágenes representativas de secciones coronales de cerebros correspondientes a varios animales que fueron implantados con MSC/P-EGFP en solución (MSC) o integradas en fibroína (SF-MSC). El implante fue realizado en el caudado-putamen (los campos mostrados corresponden a la zona del implante en esta región). Se muestran imágenes de distintos ratones sacrificados a 72 horas (A) y 4 semanas (B) tras el implante de MSC o SF-MSC. En verde (pseudocolor) se observa la fluorescencia celular asociada a la expresión de la proteína EGFP y en azul la fluorescencia a Hoechst para marcaje del ADN nuclear. Para cada espécimen se muestran ambas fluorescencias (EGFP/Hoechst) en la imagen de la derecha. Nótese que al cabo de 4 semanas (B), las MSC/P-EGFP implantadas con la fibroína (SF-MSC) ocupan mayor cantidad de territorio estriatal, que las MSC/P-EGFP inyectadas sin el biomaterial (MSC).

Figura 4.25 La integración de las MSC/P en los hidrogeles de fibroína favorece su supervivencia y retención en el parénquima cerebral. (A) Ilustraciones correspondientes a las secciones coronales analizadas en este estudio, basadas en el atlas estereotáxico de Paxinos y Franklin (Paxinos & Franklin 2004). De las 8 secciones coronales analizadas por ratón, se estimó el contenido de MSC/P viables a lo largo del tiempo post-implante, delimitando el área fluorescente correspondiente a la expresión de proteína EGFP y el área promedio ocupada por una célula trasplantada. Enmarcado en color verde se muestra la sección coronal y las coordenadas estereotáxicas donde se realizó el implante de MSC y SF-MSC (asterisco en color verde). (B) Cuantificación del número de células MSC/P-EGFP viables inyectadas en solución (MSC) o integradas en la fibroína (SF-MSC), en las secciones ilustradas en (A) y a distintos tiempos post-implante. La estimación del contenido celular se realizó en cortes coronales en el intervalo entre -2.1 mm y -0.1 mm a lo largo del eje antero-posterior. Fuera de este intervalo (más alejado del punto de inyección) no se detectó fluorescencia EGFP que pudiera ser medible en ningún grupo y/o punto temporal (no mostrado). Nótese en cada grupo analizado (MSC o SF-MSC) la progresiva reducción del número de células EGFP trasplantadas en función del tiempo post-implante. Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 2 experimentos independientes, con un mínimo de 6-8 animales por grupo (MSC y SF-MSC) y punto temporal. Para cada grupo analizado, las almohadillas indican diferencias significativas entre distintos puntos temporales (ANOVA de un factor, seguido por el test de Tukey; # $p < 0.05$).

El trasplante intracerebral se realizó en el caudado-putamen (estriado) estimándose el número de células donantes en el tejido huésped a 72 horas, 2 y 4 semanas post-implante. Tras el implante se encontraron importantes diferencias en función de si las MSC fueron inyectadas solas o integradas en el biomaterial (**Figura 4.24.**). En primer lugar, en ambos grupos y de forma independiente, se observó una progresiva reducción del contenido de MSC/P-EGFP en el tejido cerebral a largo tiempo post-implante (**Figuras 4.25. y 4.26.**), detectándose la mayor señal de fluorescencia EGFP a las 72 horas tras la inyección. Por otro lado, cuando ambos grupos de animales se compararon entre sí, en términos generales el contenido de MSC/P en el estriado fue significativamente superior cuando las células fueron inyectadas integradas en la fibroína (**Figura 4.25. y Figura 4.26.**). La detección de fluorescencia en el espectro de emisión de la proteína EGFP es compatible con un metabolismo celular preservado, algo que sólo es estrictamente posible en células viables ([Moloney et al 2010](#)). Así pues, la integración de las MSC/P en los geles de fibroína constituyó una estrategia razonable para favorecer la supervivencia del injerto y la retención celular en el estriado de los animales.

Figura 4.26 Estudio comparativo de la distribución y supervivencia del implante único de MSC/P respecto al injerto de MSC/P integradas en fibroína. Cuantificación del número de MSC/P-EGFP inyectadas en solución (círculos blancos) o integradas en fibroína (círculos negros) en función de la distancia a bregma (eje antero-posterior) a 72 horas, 2 y 4 semanas post-implante. El rectángulo vertical enmarcado en línea discontinua azul, señala la zona del implante (-1.0 mm desde el punto anatómico bregma). Para cada punto temporal y sección, los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos (MSC o SF-MSC) (ANOVA de dos factores, seguido por el test de Tukey; * $p < 0.05$).

4.3. Desarrollo y caracterización funcional de un modelo de daño cerebral en el ratón.

Para valorar la eficacia terapéutica de las MSC/P integradas en el biomaterial, se desarrolló un modelo de infarto cerebral por ligación de la arteria cerebral media (MCA) a nivel distal (dMCAO), con respecto al círculo arterial cerebral (polígono de Willis). Este modelo fue originalmente descrito en rata, por el Dr. Chen y colaboradores ([Chen et al 1986](#)) y es ampliamente utilizado en la actualidad, debido a la reproducibilidad y localización de los infartos, restringidos principalmente al cortex somatosensorial y en menor medida al cortex motor ([Tornerio et al 2017](#), [Wang et al 2016b](#)). En relación a la patología humana, este modelo animal resulta muy adecuado ya que la inmensa mayoría de los ictus isquémicos son focales y producen infartos de pequeño tamaño, generalmente asociados con cierto grado de recuperación ([Carmichael 2005](#)). En la mayor parte de los pacientes isquémicos, el proceso obstructivo es permanente, bien porque no cumplen los criterios de selección para el tratamiento del ictus en su fase aguda (t-PA y/o trombectomía), o porque sin recibir tratamiento alguno dentro de la ventana terapéutica, el trombo no es liberado espontáneamente horas después del accidente cerebrovascular ([de Los Rios la Rosa et al 2012](#), [Madsen et al 2015](#)). Es por ello que en nuestro modelo, la oclusión de la MCA se realizó de forma permanente, evitando además los fenómenos de reperusión que en muchos casos originan infartos de extensión variable pudiendo alterar las conclusiones del estudio ([Wang et al 2016b](#)).

4.3.1. Evaluación de la extensión del daño producido y regiones corticales afectadas.

Una vez realizada la cirugía, durante las 6-12 horas posteriores al infarto la mayor parte de los animales mostraron una hemiparesia contralateral al hemisferio infartado, que fue transitoria ya que 24 horas después de la cirugía no se observaron alteraciones apreciables en el comportamiento de los ratones infartados respecto a los controles ("sham"). Éstos últimos fueron sometidos a un procedimiento quirúrgico idéntico al de los ratones infartados, pero sin realizar la ligadura de la MCA. Seguidamente se examinó el territorio cerebral afectado tras la cirugía empleando técnicas de imagen basadas en resonancia magnética potenciada en difusión (RMD) (**Figura 4.27. A**) y estudios de histología, (**Figura 4.27. B**). Los estudios de RMD realizados en ratones infartados, mostraron regiones hipertensas (asociadas con zonas de alteraciones patológicas o regiones necróticas), que representaron la región afectada por el infarto. El área afectada se localizó exclusivamente en la corteza cerebral, algo que fue verificado en los estudios histológicos, empleando secciones coronales teñidas con cloruro de tetrazolio o TTC (**Figura 4.27. B**). La zona afectada se localizó principalmente en regiones más rostrales (**Figura 4.27. C**), que englobaron mayoritariamente a la corteza somatosensorial primaria (S1), mientras que la corteza motora resultó menos afectada de forma general. Por otro lado, no se observaron diferencias

significativas en el volumen de infarto en el intervalo de 72 horas tras la cirugía dMCAO, evaluado por TTC (Figura 4.27. D).

Figura 4.27. Modelo de infarto cortical en ratones de la cepa C57BL/6J. (A) Imágenes de resonancia magnética potenciada en difusión (RMD) adquiridas en un animal infartado, 48 horas después de la cirugía dMCAO. Se muestran secciones coronales a lo largo del eje antero-posterior, con regiones hiperintensas asociadas con daño cerebral restringido al cortex. (B) Imágenes representativas de secciones coronales de cerebros para examinar el área infartada en relación con el tejido intacto (no infartado). Se muestran cortes coronales teñidos con TTC 24 horas después de la inducción del infarto cortical. Se han superpuesto cortes esquemáticos basados en el atlas estereotáxico de Paxinos y Franklin (Paxinos & Franklin 2004) para identificar las áreas afectadas; S1: Corteza somatosensorial primaria; M1 y M2: Corteza motora primaria y secundaria respectivamente. Enmarcado en color rojo se indica el campo representativo somatosensorial correspondiente a la pata delantera (S₁FL). (C) Cuantificación del área infartada a lo largo del eje antero-posterior respecto a bregma. (D) Cuantificación del volumen total de infarto expresado como porcentaje de daño respecto al hemisferio intacto. Se muestran valores individuales (aspas) correspondientes a distintos ratones que fueron sacrificados a distintos tiempos post-oclusión. Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM con un mínimo de 5-7 animales por punto temporal. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de volumen infartado a lo largo del tiempo (ANOVA de un factor, seguido del test de Tukey).

4.3.2. Caracterización de la función sensorimotora mediante tests de comportamiento y potenciales provocados en ratones infartados.

El sistema somatosensorial recibe y procesa los estímulos sensoriales procedentes del tacto (mecanorrecepción), temperatura (termocepción), dolor (nociocepción) y de la posición del cuerpo (propiocepción). En un cerebro sano, la información sensorial viaja a través de neuronas aferentes, que atraviesan distintos cuerpos de relevo (médula espinal, tronco del encéfalo y tálamo), para finalmente ser procesada en la corteza somatosensorial a través de proyecciones talamo-corticales que emanan, entre otras regiones, del núcleo ventral posterior del tálamo (Alexander & Crutcher 1990, Sippy et al 2015). A su vez, la transformación sensorimotora se produce gracias a la existencia de conectividad intracortical entre el cortex somatosensorial y motor (Ferezou et al 2007, Lim et al 2012, Mohajerani et al 2013). En base a la localización y extensión del infarto en los ratones, sería esperable que los animales presentaran déficits de coordinación sensorial y motora y en paralelo, ausencia de respuesta sensorial en la región somatosensorial dañada. Para caracterizar y valorar el daño producido sobre la función sensorimotora de los animales se realizó el esquema experimental mostrado en la **Figura 4.28**. Los animales participantes en el ensayo (**tabla 4.6.**), se dividieron en 2 grupos: animales con craneotomía pero sin ligadura que actuaron como grupo control ("*sham*") y animales a los que se ligó de forma permanente la MCA (grupo infartado). Ambos grupos fueron examinados en condiciones basales (pre-ictus), y en semanas posteriores a la cirugía dMCAO. Para ello se emplearon dos tests de comportamiento que sirvieron para evaluar la coordinación sensorial y motora. Asimismo se registró la actividad de la corteza somatosensorial mediante potenciales evocados somatosensoriales (PESS).

Figura 4.28. Abordaje experimental para estudiar la función sensorimotora y la actividad de la corteza somatosensorial a lo largo del tiempo post-infarto. El estudio se realizó con dos grupos de animales: ratones infartados (sometidos a craneotomía y posterior oclusión permanente de la arteria cerebral media) y ratones control o *sham* (con craneotomía pero sin oclusión arterial). En ambos grupos de ratones la función sensorimotora fue estudiada empleando varios tests de comportamiento, en concreto el test del cilindro y de la rejilla. La actividad cortical se examinó mediante el registro de potenciales de campo provocados en la corteza somatosensorial (PESS) en ambos hemisferios en respuesta a la estimulación eléctrica de las patas delanteras. Los tests de comportamiento se realizaron una semana antes de la cirugía para obtener los valores basales, y a distintos tiempos post-infarto (semanas 1, 3, 6 y 8). En el caso de los PESS, se obtuvieron registros basales y post-infarto (semanas 1, 2, 3, 4 y 6).

Tabla 4.6. Distribución y número de animales empleados en la caracterización de la función sensorimotora y actividad evocada en ratones infartados y control.

	grupos	basal	Semanas pos-cirugía (craneotomía e isquemia)					
			1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	6 ^a	8 ^a
Experimento 1 (sólo PESS)	Control	5	5	5	5	5	5	5
	Infartado	5	4	4	4	4	4	4
Experimento 2 (PESS + test de coordinación)	Control	5	4	4	4	4	3	3
	Infartado	5	4	4	4	4	3	3
Experimento 3 (PESS + test de coordinación)	Control	5	4	4	3	3	3	3
	Infartado	5	4	4	3	3	3	3

Número total de experimentos y animales empleados para el estudio de la función sensorimotora y la actividad de la corteza somatosensorial en el modelo de infarto cortical desarrollado.

El test del cilindro y de la rejilla han sido empleados en modelos de infarto focal y global para evaluar déficits funcionales derivados de daño cerebral afectando a la coordinación sensorimotora ([Clarkson et al 2013](#), [Jin et al 2010a](#)). Ambos tests permiten evaluar si la información proveniente de las proyecciones talamo-corticales sensoriales es posteriormente integrada por el estriado a través de las aferencias cortico-talámicas, y así modular el movimiento. El test del cilindro (**Figura 4.29. A**) que examina el uso preferencial de las patas delanteras, puso de manifiesto que los animales infartados (**barras negras**) empleaban con mayor frecuencia la pata delantera no afectada o contralateral al hemisferio intacto, a diferencia de los animales control (**barras blancas**) cuyos valores en el índice de lateralidad fueron cercanos a cero, indicando que estos animales usaban ambas patas con la misma frecuencia. Los mayores índices de lateralidad en los ratones infartados se observaron una semana post-infarto, con una progresiva reducción de este parámetro sugiriendo una recuperación gradual que nunca alcanzó valores basales en el tiempo de análisis estudiado.

En el test de la rejilla (**Figura 4.29. B**) se examinó la coordinación sensorimotora de ambos grupos de animales. Cuando los animales caminaron sobre una rejilla metálica, el grupo de ratones infartados mostró, respecto a los animales control, un mayor número de resbalones (*ver metodología*) con la pata contralateral al hemisferio infartado (**panel i**). Las diferencias observadas entre ambos grupos de animales se mantuvieron a lo largo de las 8 semanas de duración del estudio, y no se observaron signos de recuperación funcional. Por otro lado, al analizar los fallos cometidos con la pata contralateral al hemisferio no operado (**Figura 4.29. B; panel ii**) en los animales infartados y controles, el porcentaje de resbalones fue muy bajo y similar entre ambos grupos en el tiempo de estudio analizado. Por tanto, ambos tests funcionales permitieron detectar déficits sensorimotrices prolongados, que fueron mucho más marcados en el caso del test de la rejilla, tal y como ha sido previamente descrito en modelos de daño cerebral por foto-trombosis ([Clarkson et al 2013](#)).

En paralelo, se examinó la actividad evocada de la corteza somatosensorial mediante el registro de PESS en respuesta a la estimulación de la pata delantera, cuyo campo representativo sensorial (S_1FL) se encontraba completamente afectado en este modelo de infarto cortical. La utilización de PESS como metodología para examinar el daño cerebral ha sido utilizada en diversos modelos animales pero de forma particularmente infrecuente en modelos de ratón ([Lye et al 1987](#), [Obeso et al 1980](#), [Schwarz et al 1992](#)).

Figura 4.29. Evolución temporal de los déficits sensorimotrices producidos tras el infarto cortical. (A) El test del cilindro evaluó la posible asimetría en el uso de las patas delanteras. En la gráfica, los valores positivos en el índice de lateralidad, indican el uso preferencial de la pata delantera contralateral al hemisferio intacto. Las barras blancas y negras representan el grupo control e infartado respectivamente. (B) En el test de la rejilla se muestra el porcentaje de fallos cometidos por el animal con la pata delantera contralateral a hemisferio operado (panel i) e intacto (panel ii). Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 2 experimentos independientes con un mínimo de 6-10 ratones por grupo (control o infartado) y punto temporal. Los asteriscos indican diferencias significativas entre ambos grupos (ANOVA de dos factores seguido por el test de Tukey; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Siguiendo el diseño experimental propuesto (**Figura 4.28.**), los electrodos se colocaron en el área S₁FL de ambos hemisferios. Ambos grupos de animales (infartados y control) fueron registrados basalmente y durante varias semanas después de la cirugía dMCAO. Tras la estimulación eléctrica del nervio mediano de ambas patas delanteras, se registró la respuesta contralateral correspondiente en ambos hemisferios cerebrales (**Figura 4.30.**). En situación basal (pre-cirugía), la estimulación de la pata delantera generó una respuesta formada por varios componentes de onda, que alcanzó su máxima activación en torno a 20 ms después de la estimulación (**Figura 4.30. A**, pico N1, flechas).

Figura 4.30. Estudio de los potenciales de campo evocados en la corteza somatosensorial en animales infartados. (A) Ejemplos representativos de los potenciales evocados somatosensoriales (PESS) registrados en la corteza somatosensorial en condiciones basales (pre-cirugía) y post-cirugía en el grupo control (panel i; sólo craneotomía) e infartado (panel ii y iii; craneotomía y ligadura arterial). En ambos grupos de animales se registró la actividad contralateral en ambos hemisferios; intacto (trazos azules) y operado (trazos negros) respectivamente. La intensidad de actividad evocada se determinó tomando el valor máximo de amplitud de la onda negativa N1 (flechas) que emerge aproximadamente 20 ms después de la estimulación eléctrica de la pata contralateral. (B) Se muestran los valores de amplitud (N1) normalizados (respecto al valor basal, pre-cirugía) en el hemisferio intacto (líneas azules) y operado (líneas negras) en los grupos infartado (panel i) y control (panel ii). Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes, con un mínimo de 10-15 animales por grupo (control o infartado) y punto temporal. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los valores basales (ANOVA de dos factores seguido por el test de Tukey; * $p < 0,05$).

Tras la cirugía, en la mayoría de los ratones infartados se produjo una abolición sustancial de la respuesta evocada en el hemisferio dañado, mientras que en el hemisferio no afectado, la respuesta evocada resultó progresivamente mayor que en la situación basal (**Figura 4.30. A, paneles ii y iii**), sugiriendo la existencia de fenómenos de hiperexcitabilidad en el hemisferio intacto. Sólo en dos ratones se observó una recuperación parcial de respuesta evocada en el hemisferio infartado (**Figura 4.30. A, panel iii, líneas negras**), si bien los fenómenos de hiperexcitabilidad estuvieron siempre presentes en el hemisferio intacto de la mayoría de los ratones estudiados. Por el contrario, la respuesta evocada en los ratones control se mantuvo relativamente estable en ambos hemisferios respecto a la situación basal (**Figura 4.30. A, panel i**). La cuantificación de la amplitud del pico N1 (**Figura 4.30. B**) a lo largo del tiempo post-cirugía, reveló como en los animales infartados la respuesta en el hemisferio infartado (**círculos y líneas negras**) disminuyó notablemente tras la cirugía, mientras que en el hemisferio intacto (**círculos blancos y líneas azules**) se detectó un ligero incremento en la respuesta contralateral a lo largo de las semanas post-infarto. Por el contrario los animales del grupo control mostraron un porcentaje de respuesta contralateral similar en ambos hemisferios y mantenida a lo largo del tiempo de estudio (**Figura 4.30 B; panel ii**).

Figura 4.31. Relaciones de actividad evocada contralateral en la corteza somatosensorial de ambos hemisferios. (A) Relación entre la respuesta evocada del hemisferio operado e intacto ($N1_{operado}/N1_{intacto}$), para los ratones control (círculos blancos) e infartados (círculos negros) a lo largo del tiempo post-cirugía. (B) Valores de latencia del pico máximo de respuesta evocada (N1) respecto a la aplicación del estímulo eléctrico (tiempo=0) en el hemisferio intacto (líneas discontinuas) y operado (líneas continuas) en los animales control (gráfica superior) e infartados (gráfica inferior). Los valores se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes, con un mínimo de 10-15 ratones por grupo (control o infartado) y por punto temporal. En (A) los asteriscos muestran diferencias significativas respecto al valor basal de cada grupo (ANOVA de dos factores seguido por el test de Tukey; $**p<0,01$).

Una forma alternativa de ilustrar los resultados anteriores fue estimar la relación (ratio) de respuestas contralaterales entre ambos hemisferios ($PESS^{\text{hemisferio operado}} / PESS^{\text{hemisferio intacto}}$). Con este tipo de análisis, los valores de ratio en el grupo de animales control (**Figura 4.31. A; círculos blancos**) estuvieron siempre cercanos al 100% a lo largo de las 8 semanas de estudio, es decir, los valores de amplitud evocada fueron similares en el hemisferio no operado y el operado. Sin embargo, en el grupo de animales infartados (**círculos negros**), el ratio entre ambos hemisferios se redujo drásticamente debido a la reducción de la respuesta en el hemisferio infartado y al aumento de excitabilidad del hemisferio no dañado. Pese a las anomalías presentadas en cuanto a la amplitud de respuesta evocada contralateral por los animales infartados, la latencias de respuesta en ambos hemisferios no resultaron afectadas (**Figura 4.31 B; gráfica inferior**) como tampoco lo estuvieron en el caso de los animales control (**gráfica superior**).

Dado que los animales infartados mostraron fuertes déficits sensorimotores (evaluado por los tests funcionales) y en paralelo una disminución en la capacidad de respuesta del área S₁FL en el hemisferio dañado, podría resultar que existiese una relación causa-efecto. Considerando ambos grupos de animales simultáneamente, los valores más reducidos de ratio se correlacionaron con los mayores déficits funcionales obtenidos en ambos tests funcionales (rejilla y clindro) (**Figura 4.32**). Sin embargo, cuando únicamente incluimos en el análisis el grupo de los animales infartados, sólo en el test de la rejilla obtuvimos una correlación significativa (*test del cilindro* $r = -0.39$, $p = 0.17$; *test de la rejilla* $r = -0.89$, $p < 0.01$). Una observación adicional, fue la correlación existente entre la mayor amplitud de respuesta evocada en el hemisferio intacto y el menor número déficits en el test de la rejilla ($r = -0.55$ $p < 0.01$). Por tanto, nuestros resultados avalaron la especial sensibilidad del test de la rejilla para identificar déficits sensorimotores que estuvieron asociados con cambios significativos de respuesta evocada en ambos hemisferios.

Figura 4.32. Reducciones severas de actividad evocada en la corteza somatosensorial correlacionan con un grado mayor de déficit sensorimotor. Correlación de Pearson entre la relación de amplitud contralateral ($N1^{\text{operado}}/N1^{\text{intacto}}$) y el índice de lateralidad (A) o el porcentaje de fallos (B) obtenidos en el test del cilindro y de la rejilla respectivamente. En estos análisis se utilizaron el mismo número de animales en ambos grupos (control o infartado). Los datos incluidos en el estudio corresponden a valores obtenidos 1, 3, 6 y 8 semanas después la cirugía, siguiendo los criterios de inclusión y exclusión descritos en la sección de materiales y métodos. En las gráficas se muestran diferentes símbolos para desenmascarar valores similares entre distintos animales. Los coeficientes de correlación se muestran en la parte superior derecha de cada gráfica. Los valores de correlación fueron significativos con ambos tests de comportamiento, pero más marcados en el test de la rejilla.

Por último se examinaron en ambos hemisferios los PESS generados en respuesta a un estímulo ipsilateral. El motivo de este estudio fue explorar si la pérdida de actividad funcional en el hemisferio dañado podría traducirse en alteraciones en la región homóloga del hemisferio contrario, ya que está relativamente bien establecido que ambos hemisferios están conectados entre sí, excitándose e inhibiéndose recíprocamente a través de fibras del cuerpo calloso ([Gonchar et al 1995](#)).

Figura 4.33. Alteración de la conectividad interhemisférica en animales infartados. (A) Ejemplos representativos de PESS obtenidos en respuesta a la estimulación ipsilateral de las patas delanteras. Se muestran registros correspondientes al hemisferio intacto (panel i) y dañado (panel ii) a lo largo de varias semanas post-infarto. A la izquierda se muestran ilustraciones mostrando la posición de los electrodos en ambos hemisferios; intacto e infartado (área gris), con respecto a la pata estimulada ipsilateralmente. (B) Se muestran los valores de amplitud (N1) normalizados (respecto al valor basal, pre-cirugía) en el hemisferio intacto (círculos blancos) y dañado (círculos negros) a lo largo de 8 semanas de estudio. Nótese en (A) y (B) como la actividad evocada ipsilateral se reduce dramáticamente en ambos hemisferios tras el infarto unilateral denotando falta de conectividad entre ambos hemisferios. Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes con un mínimo de 10-15 ratones por punto temporal. Los asteriscos indican diferencias significativas entre la amplitud de ambos hemisferios para cada punto temporal (ANOVA de dos factores seguido por el test de Tukey; * $p < 0.05$; # $p < 0.08$).

En este estudio, la respuesta ipsilateral se caracterizó, por la presencia de una onda negativa con un pico N1 de menor amplitud y mayor latencia de aparición tras el estímulo, en comparación con la respuesta contralateral (**Figura 4.33. A**). Las amplitudes y latencias de respuesta ipsilateral en los animales control fueron similares en ambos hemisferios antes (**Tabla 4.7.**) y tras la craneotomía a lo largo de las 8 semanas de análisis (datos no mostrados), a diferencia de lo que sucedió en el grupo de animales infartados, donde la respuesta ipsilateral en ambos hemisferios disminuyó drásticamente, (**Figura 4.33. B**), observándose un progresivo incremento en la respuesta del hemisferio dañado en las últimas semanas de estudio. De forma notoria, este incremento se correlacionó con la actividad contralateral generada en el hemisferio intacto ($r=0.53$, $p<0.01$), indicando que el fenómeno de hiperexcitabilidad podría ser responsable en parte, de la progresiva mayor capacidad de respuesta ipsilateral en el hemisferio dañado.

Tabla 4.7. Valores de las amplitudes de respuesta en el pico N1, y sus latencias obtenidas como respuesta a un estímulo contralateral e ipsilateral en ambos hemisferios, en ratones C57BL/6J no infartados.

	Estimulación contralateral		Estimulación ipsilateral	
	Amplitud (μV)	Latencia (ms)	Amplitud (μV)	Latencia (ms)
Hemisferio derecho	65.09 $\pm$ 5.45	21.23 $\pm$ 1.20	42.21 $\pm$ 6.01	27.65 $\pm$ 1.15
Hemisferio izquierdo	70.59 $\pm$ 5.92	19.75 $\pm$ 0.42	49.01 $\pm$ 6.21	28.53 $\pm$ 1.20

Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes con un total de 15 animales.

En resumen, durante esta primera fase del estudio se desarrolló un modelo de infarto cerebral que en los ratones C57BL/6J, originó déficits sensorimotores que correlacionaron (principalmente en el caso de test de la rejilla) con cambios de actividad evocada en ambos hemisferios. Por otro lado, la marcada disminución de respuesta ipsilateral en ambos hemisferios sugiere la existencia de alteraciones en la conectividad inter-hemisférica en este modelo concreto de infarto cortical.

4.3.3. Análisis comparativo del modelo de infarto cortical en ratones de las cepas C57BL/6J y CD-1.

En estudios en roedores, se ha observado que la inducción de un infarto cortical por la oclusión permanente de la MCA, produce volúmenes de infarto e incluso déficits funcionales que difieren en función de la cepa utilizada ([Carmichael 2005](#), [Keum & Marchuk 2009](#)). La variabilidad en la cantidad de territorio cortical afectado, ha sido atribuida a mecanismos de tolerancia isquémica y vías de neuroprotección diferentes entre las distintas cepas de ratón. Asimismo, se han encontrado diferencias en la anatomía cerebrovascular. En concreto, los ratones C57BL/6J presentan una red de circulación colateral bien desarrollada, a diferencia de la prácticamente ausencia de circulación colateral en ratones BALB/c ([Keum & Marchuk 2009](#), [Zhang et al 2010](#)). Por otro lado, la expresión diferencial en genes relacionados con mecanismos de inflamación (citoquinas, complejo mayor de histocompatibilidad, reactividad glial), parecen también contribuir a una mayor sensibilidad celular a la muerte tras una situación isquémica. Por ejemplo, en el modelo dMCAO, los ratones de la cepa C57BL/6J exhiben volúmenes de infarto significativamente inferiores a los de las cepas BALB/c, lo que también ha sido relacionado a un locus concreto del cromosoma 7 ([Keum & Marchuk 2009](#)).

En nuestro modelo de daño cerebral, la cepa C57BL/6J fue inicialmente seleccionada porque en una gran mayoría de los estudios de infarto focal para explorar mecanismos espontáneos o inducidos de neuroprotección o neurorestauración se utilizan modelos de ratón silvestres o modificados genéticamente sobre este fondo genético (C57BL/6J). Sin embargo, del análisis de los resultados obtenidos durante la primera fase de este objetivo, pudimos determinar que los ratones C57BL/6J sometidos a dMCAO presentaban cierta variabilidad en la extensión del infarto (**Figura 4.27. D**) que en parte podría ser responsable, de la desviación observada entre especímenes en los registros de actividad evocada. Por tanto, resultaba muy conveniente utilizar un modelo de cepa alternativo, que por su diferente anatomía vascular y/o menor tolerancia isquémica, pudiese originar un infarto de mayor extensión cortical y menor variabilidad entre especímenes. Basándonos en estudios previos de diferente susceptibilidad al daño hipóxico y a la mayor reproducibilidad en cuanto a extensión de corteza dañada tras la isquemia focal, se decidió estudiar y caracterizar el modelo dMCAO en la cepa de ratón CD-1 ([Huang et al 2013](#), [Li et al 2009a](#), [Rosell et al 2013](#), [Zwemer et al 2007](#)).

4.3.3.1. Extensión y distribución del infarto en ratones C57BL/6J y CD-1.

ras 72 horas post-isquemia, la tinción TTC reveló que los ratones de la cepa CD-1 presentaban claramente una mayor afectación de territorio cortical que los ratones C57BL/6J, si bien en ambas cepas la corteza somatosensorial primaria (S1) siempre resultaba dañada (**Figura 4.34. A**). Al estudiar la distribución del infarto cortical a lo largo del eje rostro-caudal, se observó cómo en los ratones C57BL/6J (**Figura 4.34. B, panel i**), las rodajas coronales más afectadas se localizaron en

el intervalo +1mm a -1mm respecto a bregma con menor afectación en las zonas más caudales. Sin embargo, en los ratones CD-1, la distribución fue diferente, desplazándose hacia localizaciones más caudales y con menor grado de afectación en posiciones rostrales (**panel ii**).

Figura 4.34. Extensión de daño y alteraciones sensorimotoras en ratones infartados de las cepas C57BL/6J y CD-1. (A) Imágenes representativas de secciones coronales de cerebro teñidas con TTC 72 horas después de la inducción del infarto cerebral. Nótese como en los ratones CD-1 el área infartada se extiende prácticamente a la totalidad de las secciones coronales analizadas, a diferencia del infarto menor producido en ratones C57BL/6J con afectación más rostral. (B) Cuantificación del área infartada distribuida a lo largo del eje antero-posterior con respecto a bregma, en ratones C57BL/6J (**panel i**) y CD-1 (**panel ii**). (C) Promedio del porcentaje de fallos cometidos con la pata delantera contralateral a ambos hemisferios basalmente (pre-cirugía) y 72 horas post-infarto en los ratones C57BL/6J (**panel i**) y CD-1 (**panel ii**). En ambas cepas el infarto se realizó ocluyendo la arteria cerebral media del hemisferio derecho (barras negras). Nótese tras el

CONTINUACIÓN Figura 4.34.

infarto, la ausencia de déficits con la pata contralateral al hemisferio intacto (barras blancas). (D) Relación entre el porcentaje de volumen de infarto y el porcentaje de fallos con la pata contralateral al hemisferio derecho en ratones C57BL/6J (panel i) y CD-1 (panel ii). Los círculos blancos y negros corresponden a los valores obtenidos basalmente y 72 horas post-infarto respectivamente. En la parte superior de cada gráfica se muestran los coeficientes de correlación (considerando exclusivamente los ratones infartados) entre los déficits sensorimotrices examinados con el test de la rejilla y el volumen total de infarto. Los valores de correlación fueron significativos únicamente en el caso de los ratones de la cepa CD-1. Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes con 12 animales por cada cepa de ratón. En (C), los asteriscos indican diferencias significativas en el porcentaje de fallos en animales infartados respecto a sus correspondientes valores basales (Test de Student; ** $p < 0.01$).

Por otro lado, se estudiaron los déficits funcionales derivados del infarto cortical empleando el test de la rejilla (**figura 4.34. C**). Con este test, ambas cepas de ratón (**panel i y ii**) presentaron mayores porcentajes de fallos con la pata contralateral al hemisferio infartado (**barras negras**). Sin embargo, el porcentaje de fallos fue considerablemente mayor y menos variable entre ratones CD-1. Además, exclusivamente en los ratones CD-1, el porcentaje de volumen cerebral infartado se correlacionó significativamente con los déficits sensorimotrices evaluados con el test de la rejilla (**Figura 4.34. D, panel ii**). De hecho los ratones C57BL/6J, mostraron mayor variabilidad en ambos parámetros, volumen total de infarto y porcentaje de fallos con la pata contralateral al hemisferio infartado (**Figura 4.34. D, panel i**).

4.3.3.2. Estudio de actividad evocada en corteza somatosensorial y motora en ratones C57BL/6J y CD-1.

A continuación se examinó la actividad cortical provocada planteando una nueva aproximación experimental basada en el registro simultáneo de actividad en regiones corticales infartadas y adyacentes a la zona afectada por el daño (región peri-lesional). Estudios previos han demostrado que los fenómenos de plasticidad juegan un papel crítico en la recuperación espontánea de animales ([Brown et al 2009](#), [Brown et al 2007](#)) y pacientes ([Benowitz & Carmichael 2010](#), [Dancause 2006a](#)), además se han descrito fenómenos de remodelación cerebral asociado al crecimiento dendrítico/axonal tras el tratamiento con células madre neurales ([Andres et al 2011](#)). Por el contrario, otros estudios han sugerido que el proceso de recuperación funcional asociado al implante de células terapéuticas puede ser debido a la existencia de una actividad emergente en la zona infartada (dañada) ([Ramos-Cabrer et al 2010](#)). En virtud de estos antecedentes, se planteó el registro de la respuesta provocada en el área representativa de la corteza somatosensorial de la pata delantera (S₁FL; región afectada por el infarto), y en regiones peri-lesionales correspondientes al área motora representativa de la pata delantera en su posición más caudal (m₁CFL), tal y como se muestra en el diagrama de la **Figura 4.35**. La representación motora de las patas delanteras, constituye aproximadamente el 40% de la corteza motora en roedores. A su vez, el área motora representativa de las patas delanteras, se subdivide en dos regiones: una más frontal (m₁RFL), con apenas actividad motora, y otra más caudal (m₁CFL), a la que se le atribuye el mayor porcentaje del movimiento de los dedos, muñeca y codo de la extremidad delantera

([Tennant et al 2011](#)). Por el contrario, la representación somatosensorial de las patas delanteras no se encuentra subdividida ([Ferezou et al 2007](#)).

Figura 4.35. Esquema ilustrativo que muestra la posición de los electrodos de registro para evaluar la actividad cortical provocada en regiones peri-infartadas (m_1CFL) e infartadas (S_1FL) de ratones de las cepas C57BL/6J y CD-1. En la imagen superior se muestra un plano horizontal con la posición relativa del campo representativo somatosensorial (S_1FL , sombreado en color azul) y motor (sombreado en color verde) de la pata delantera del ratón, basado en los estudios de ([Alia et al 2016](#), [Ferezou et al 2007](#), [Hira et al 2013](#), [Hira et al 2015](#), [Lim et al 2012](#), [Tennant et al 2011](#)). El campo motor de la pata delantera está formado por una región caudal (m_1CFL) y otra más rostral (m_1RFL). Los círculos verde y azul muestran la posición relativa de los electrodos para el registro de la actividad evocada en m_1CFL y S_1FL respectivamente. Para mayor clarificación, en la imagen inferior se muestran planos coronales correspondientes a las secciones (Paxinos; ([Paxinos & Franklin 2004](#)) donde se implantaron los electrodos de registro en relación a ambos ventrículos y al cortex motor y somatosensorial. En estas secciones se indican los campos representativos motor (color verde) y somatosensorial (color azul) para la pata delantera. (B) Se representan los campos somatosensorial y motor (planos horizontal y coronal) ilustrados en el panel A respecto al territorio cortical dañado en el modelo dMCAO (sombreado en color rojo pálido), que en ambas cepas, aunque con diferencias en el tamaño de infarto, afecta casi totalmente a la región S_1FL y parcialmente al campo motor m_1CFL , ya que en el ratón ambos campos muestran solapamiento topográfico parcial ([Tennant et al 2011](#)). Durante el tiempo de estudio, los electrodos de registro ocuparon posiciones fijas en el tejido afectado ("core" del infarto; electrodo S_1FL) y en la región peri-infartada (electrodo m_1CFL) respectivamente.

Las figuras 4.36 y 4.37 muestran la caracterización de respuestas evocadas en los ratones C57BL/6J (**Figura 4.36.**) y CD-1 (**Figura 4.37.**) en una situación basal (pre-infarto). Por un lado, tal y como se esperaba de los resultados de la **sección 4.3.2.**, la aplicación de un estímulo contralateral en los ratones C57BL/6J indujo respuestas provocadas en el área S₁FL del hemisferio izquierdo (**Figura 4.36. C; panel i**) y derecho (**Figura 4.36. D; panel i**), con varios componentes de onda y máxima amplitud de activación aproximadamente 20 ms después de la estimulación. En paralelo, esta misma estimulación contralateral causó una respuesta evocada en el área motora m₁CFL, que en su máximo resultó de menor amplitud (**Tabla 4.8.**) y mayor latencia (**Tabla 4.9.**) que la respuesta máxima detectada en S₁FL, con un intervalo de latencias cercano a 4 ms (Hemisferio derecho: 4.07 ± 0.68 ms; Hemisferio izquierdo: 3.63 ± 0.67 ms; $p < 0.01$). Además, se observó una fuerte correlación de respuestas entre S₁FL y m₁CFL en ambos hemisferios cuando éstos se analizaron separadamente (**Tabla 4.10.**), sugiriendo que la actividad registrada en el cortex motor m₁CFL es circuitalmente dependiente de la actividad provocada en la corteza somatosensorial S₁FL tras un estímulo sensorial.

Tabla 4.8. Porcentaje de actividad evocada intra-hemisférica en m₁CFL con respecto a la respuesta registrada en S₁FL ante un estímulo eléctrico contralateral e ipsilateral en ratones de las cepas C57BL/6J y CD-1, en situación basal (pre-infarto).

	Respuesta contralateral		Respuesta ipsilateral	
	C57BL/6J	CD-1	C57BL/6J	CD-1
Hemisferio derecho	46,87 $\pm$ 4,47	26,16 $\pm$ 3,42	94,30 $\pm$ 4,81	94,19 $\pm$ 8,26
Hemisferio izquierdo	43,12 $\pm$ 7,28	24,76 $\pm$ 2,80	91,42 $\pm$ 4,61	94,25 $\pm$ 15,52

Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 2 experimentos independientes, con un total de 12 animales por cepa de ratón.

En los ratones C57BL/6J también se analizó el patrón de activación en S₁FL y m₁CFL frente un estímulo eléctrico ipsilateral (**Figura 4.36 C y D, paneles ii**), produciéndose respuestas evocadas de menor amplitud (**Hemisferio izquierdo**: S₁FL^{ipsilateral} 35,92% $\pm$ 4,54; m₁CFL^{ipsilateral} 30,30% $\pm$ 3,71; **Hemisferio derecho**: S₁FL^{ipsilateral} 50,90% $\pm$ 8,41; m₁CFL^{ipsilateral} 44,57% $\pm$ 6,93) y de mayor latencia (**Tabla 4.9.**) que la respuesta contralateral, tal y como se esperaba de los estudios previamente descritos en la **sección 4.3.2.** (**Figura 4.33**). Sin embargo, la amplitud máxima de activación ipsilateral generada en S₁FL fue similar a la observada en m₁CFL (**Figura 4.36. E y F; ipsilateral; Tabla 4.8.**).

Figura 4.36. Estudios de actividad evocada en la corteza somatosensorial y motora en respuesta a la estimulación contralateral e ipsilateral en ratones NO infartados de la cepa C57BL/6J. (A & B) Ilustraciones mostrando la colocación de los electrodos para el registro de potenciales evocados en la corteza somatosensorial (campo representativo S₁FL; electrodo azul) y motora (m₁CFL; electrodo verde) en relación con la pata estimulada contralateral- (panel i) e ipsilateral-mente (panel ii) al hemisferio izquierdo (panel A) y derecho (panel B) respectivamente. (C & D) Se muestran registros crudos promediados de los potenciales evocados correspondientes a 12 ratones registrados en la corteza somatosensorial (trazados azules) y motora (trazados verdes), obtenidos con el abordaje experimental descrito en las correspondientes ilustraciones superiores (A & B). En los registros, la región sombreada se corresponde con los valores de desviación encontrados en cada grupo. Las flechas indican el valor máximo de activación de polaridad negativa (N1) en respuesta al estímulo eléctrico. (E & F) Porcentaje de respuesta evocada en el hemisferio izquierdo (E) y derecho (F). En ambas gráficas todos los valores de actividad evocada se han normalizado respecto a la respuesta contralateral registrada en el área somatosensorial (S₁FL) del hemisferio correspondiente. Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 2 experimentos independientes con un mínimo de 12 animales. Los asteriscos indican diferencias significativas entre la actividad registrada en la corteza somatosensorial S₁FL y motora m₁CFL (Test de Student, *p<0.05).

Figura 4.37. Estudios de actividad evocada en la corteza somatosensorial y motora en respuesta a la estimulación contralateral e ipsilateral en ratones NO infartados de la cepa CD-1. (A & B) Ilustraciones mostrando la colocación de los electrodos para el registro de potenciales evocados en la corteza somatosensorial (campo representativo S₁FL; electrodo azul) y motora (m₁CFL; electrodo verde) en relación con la pata estimulada contralateral- (panel i) e ipsilateral-mente (panel ii) al hemisferio izquierdo (panel A) y derecho (panel B) respectivamente. (C & D) Se muestran registros crudos promediados de los potenciales evocados correspondientes a 12 ratones registrados en la corteza somatosensorial (trazados azules) y motora (trazados verdes), obtenidos con el abordaje experimental descrito en las correspondientes ilustraciones superiores (A & B). En los registros la región sombreada se corresponde con los valores de desviación encontrados en cada grupo. Las flechas indican el valor máximo de activación de polaridad negativa (N1) en respuesta al estímulo eléctrico. (E & F) Porcentaje de respuesta evocada contralateral e ipsilateral en el hemisferio izquierdo (E) y derecho (F). En ambas gráficas, todos los valores de actividad evocada se han normalizado respecto a la respuesta contralateral registrada en el área somatosensorial (S₁FL) del hemisferio correspondiente. Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 2 experimentos independientes con un mínimo de 12 animales. Los asteriscos indican diferencias significativas entre la actividad registrada en la corteza somatosensorial (S₁FL) y motora (m₁CFL) (Test de Student; **p<0.01).

Una vez caracterizada en situación basal (pre-infarto) las respuestas contra- e ipsilaterales generadas en las áreas m_1CFL y S_1FL de los ratones de la cepa C57BL/6J, se realizó un estudio idéntico con la cepa CD-1 (**Figura 4.37.**). El análisis de la respuesta en el hemisferio izquierdo (**Figura 4.37. A y C**) y derecho (**Figura 4.37. B y D**) frente a un estímulo contralateral (**paneles i**) e ipsilateral (**paneles ii**) denotó patrones de activación muy similares a los obtenidos con ratones C57BL/6J, aunque con ciertas diferencias en la amplitud máxima de respuesta en ambas regiones S_1FL y m_1CFL .

De forma similar a la cepa C57BL/6J, en los ratones CD-1 la respuesta contralateral registrada en la corteza somatosensorial (S_1FL) de ambos hemisferios (**Figura 4.37. C y D; trazados azules**) fue cinéticamente más rápida, y de mayor amplitud a la registrada en la corteza motora m_1CFL (**Figura 4.37. C y D; trazados verdes**). Sin embargo, en ambos hemisferios, la respuesta máxima contralateral generada en m_1CFL representó un 25 % de la activación registrada en S_1FL (**Tabla 4.8.**), un hecho que contrasta con la activación del 40-45 % observada para los ratones C57BL/6J (**Tabla 4.8.**) y que podría reflejar ciertas diferencias en organización somatotípica entre ambas cepas de ratón.

De la misma manera que en los ratones C57BL/6J, en los ratones CD-1 la latencia de respuesta máxima en S_1FL frente al estímulo contralateral fue de aproximadamente 20 ms, con un retraso en m_1CFL cercano a los 4 ms (**Hemisferio derecho**: 3.45 ± 0.57 ms; $p < 0.01$; **Hemisferio izquierdo**: 3.92 ± 0.81 ms; $p < 0.01$) (**Tabla 4.8.**). Asimismo, también se obtuvo una fuerte correlación entre las amplitudes de respuesta contralateral somatosensorial y motora (**Tabla 4.10.**). En ambas cepas de ratón, el intervalo de latencias y la correlación entre las repuestas generadas en S_1FL y m_1CFL resultan compatibles con la existencia de cierto grado de conectividad intra-cortical entre ambas representaciones para la pata delantera.

Tabla 4.9. Latencias de la amplitud máxima de respuesta contralateral e ipsilateral en los ratones de las cepas C57BL/6J y CD-1, pre-isquemia

		Respuesta contralateral		Respuesta ipsilateral	
		C57BL/6J	CD1	C57BL/6J	CD1
Hemisferio derecho	S_1FL	19.89 ± 0.87	17.20 ± 0.81	34.75 ± 1.33	26.70 ± 1.43
	m_1CFL	23.97 ± 0.89	20.65 ± 0.83	35.28 ± 1.11	26.35 ± 1.44
Hemisferio izquierdo	S_1FL	20.05 ± 0.77	17.33 ± 0.99	32.96 ± 1.61	25.22 ± 1.10
	m_1CFL	23.69 ± 1.10	21.25 ± 0.92	33.97 ± 0.77	26.85 ± 1.39

Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 2 experimentos independientes, con un total de 12 animales por cepa.

En cuanto a la respuesta ipsilateral registrada en los ratones CD-1, las amplitudes registradas tanto en la corteza somatosensorial (**barras azules**), como motora (**barras verdes**) fueron muy similares en ambos hemisferios (**Figura 4.37. E y F**). En ambos casos, las amplitudes de respuesta ipsilateral fueron de menor amplitud a las registradas en la corteza somatosensorial S₁FL frente al estímulo contralateral de la misma extremidad (**Hemisferio izquierdo**: S₁FL^{ipsilateral}: 25,71% ± 3,99; m₁CFL^{ipsilateral}: 21,23% ± 3,81; **Hemisferio derecho**: S₁FL^{ipsilateral}: 26,51% ± 4,97; m₁CFL^{ipsilateral}: 24,36% ± 4,58). Aunque la respuesta ipsilateral se encontró retrasada en el tiempo con respecto a la contralateral (**Tabla 4.9.**), un hallazgo interesante en ambas cepas de ratón fue que la máxima activación ipsilateral se produjo de forma prácticamente simultánea en ambas regiones S₁FL y m₁CFL (**Tabla 4.9.**), a diferencia del marcado intervalo de latencia de respuestas registrado entre ambas regiones tras la estimulación contralateral, anteriormente comentado.

Tabla 4.10. Correlación entre las amplitudes de respuesta evocada contralateral en las cortezas somatosensorial S₁FL y motora m₁CFL de ambos hemisferios en ratones C57BL/6J y CD1, en situación basal (pre-infarto) y una semana post-infarto.

	Basal			Post-infarto	
	C57BL/6J	CD-1		C57BL/6J	CD-1
$r = 0.66$ $p < 0.05$	$r = 0.79$ $p < 0.01$		$r = 0.71$ $p < 0.01$	No determinado
$r = 0.57$ $p < 0.05$	$r = 0.65$ $p < 0.05$		$r = 0.41$ $p < 0.05$	$r = 0.35$ $p < 0.05$

En los mismos ratones anteriormente caracterizados correspondientes a ambas cepas de ratón, estudiamos el efecto que un infarto cortical podría provocar sobre las respuestas evocadas en S₁FL y m₁CFL y la conectividad intra-cortical de ambos hemisferios, dañado y no afectado. Una semana después de la cirugía dMCAO, se registró la respuesta contralateral en el hemisferio intacto y dañado (**Figura 4.38.**). En ambas cepas, la actividad provocada en el hemisferio intacto (**paneles i**) exhibió un incremento moderado de amplitud tanto en S₁FL (**trazados y barras azules**) como en m₁CFL (**trazados y barras verdes**) con respecto a la situación basal en S₁FL (**línea discontinua**), siendo este incremento más notorio en los ratones de la cepa C57BL/6J.

Figura 4.38. Actividad evocada contralateral en ratones infartados de las cepas C57BL/6J y CD-1. (A & B) Ilustraciones mostrando la colocación de los electrodos para el registro de potenciales provocados en la corteza somatosensorial (campo representativo S₁FL; "core" del infarto; electrodo azul) y motora (m₁CFL; área peri-infartada/intacta; electrodo verde) en relación con la pata estimulada contralateralmente. En color rojo pálido se representa el área dañada del hemisferio afectado. (C & D) Se muestran registros crudos promediados en S₁FL (trazados azules) y m₁CFL (trazados verdes) de ambos hemisferios, en ratones C57BL/6J y CD-1. Los trazados mostrados corresponden a animales registrados 1 semana post-infarto. En los registros, la región sombreada se corresponde con los valores de desviación encontrados en cada grupo. (E & F) Porcentaje de actividad evocada. Todos los valores de actividad se normalizaron respecto a la respuesta registrada en el área somatosensorial (S₁FL) para cada hemisferio en situación basal pre-infarto (línea discontinua; figuras 4.36 y 4.37). Los datos se muestran como la media ± EEM de 2 experimentos independientes con un mínimo de 12 animales por cepa de ratón (C57BL/6J y CD-1). Para cada hemisferio estudiado, las almohadillas indican diferencias significativas entre la actividad evocada generada y su valor basal. Los asteriscos indican diferencias significativas entre la actividad registrada en la corteza somatosensorial (S₁FL) y motora (m₁CFL) (Test de Student; *p=0.05; **p<0.01; #p=0.05; ##p<0.01).

Pese al incremento en la amplitud de respuesta registrada en el hemisferio intacto, la relación de amplitudes entre m_1CFL y S_1FL se mantuvo en ambas cepas de ratón en valores muy similares a la situación basal (**Tablas 4.8. y 4.11.**) y la actividad máxima en ambas regiones correlacionó entre sí (**tabla 4.10.**).

Tabla 4.11. Porcentaje de actividad registrada en m_1CFL con respecto a la registrada en S_1FL ante un estímulo eléctrico contralateral, una semana post-infarto.

	Respuesta contralateral	
	C57BL6	CD1
Hemisferio derecho (Dañado)	63,92 ± 11,69	No determinado
Hemisferio izquierdo (Intacto)	47,97 ± 5,21	26,78 ± 4,86

Los datos se muestran como la media ± EEM de 2 experimentos independientes, con un total de 12 animales por cepa de ratón.

Por el contrario, y coincidiendo con los resultados obtenidos durante la primera fase de este objetivo, la respuesta contralateral en el hemisferio infartado (**Figura 4.38. C y D; paneles ii**) se redujo considerablemente en S_1FL y m_1CFL de la cepa C57BL/6J (**Figura 4.38. E**) y se abolió casi completamente en los ratones CD-1 (**Figura 4.38. F**), siendo probablemente compatible con el mayor volumen de infarto originado en esta última cepa. La reducida respuesta post-infarto en S_1FL en ambas cepas podría justificar la reducción/abolición de respuesta en m_1CFL , dado que la activación en m_1CFL parece circuitalmente dependiente de la actividad previa en S_1FL , tal y como sugieren nuestros resultados previos en animales no infartados. Por otro lado, la reducción de respuesta evocada en el hemisferio infartado y el moderado incremento de actividad en el hemisferio intacto no supusieron modificaciones en el valor de latencia correspondiente a la máxima respuesta provocada (**Tabla 4.9. Vs 4.12.**). Además, en los ratones de la cepa C57BL/6J, cuyos potenciales evocados contralaterales en el hemisferio infartado no resultaron completamente abolidos, la relación m_1CFL/S_1FL en el hemisferio dañado resultó ligeramente superior a lo observado en la situación basal aunque sin alcanzar diferencias significativas (**Tabla 4.11.**), y se mantuvo la correlación de respuestas entre m_1CFL y S_1FL (**Tabla 4.10.**).

Tabla 4.12. Latencias de los picos de respuesta máxima contralaterales en los ratones de las cepas C57BL/6J y CD-1, 1 semanas post-infarto

		Respuesta contralateral	
		C57BL/6J	CD1
Hemisferio derecho (Dañado)	S_1FL	21.35 ± 1.13	No determinado
	m_1CFL	24.72 ± 1.19	
Hemisferio izquierdo (Intacto)	S_1FL	22.24 ± 1.25	17.77 ± 1.25
	m_1CFL	26.17 ± 1.28	20.23 ± 1.02

Los datos se muestran como la media ± EEM de 2 experimentos independientes, con un total de 12 animales por cepa de ratón.

Por otro lado, 1 semana post-infarto, el registro de la actividad evocada ipsilateral mostró una reducción considerable en el porcentaje de respuesta registrada en el hemisferio intacto, que fue mucho más marcada en los ratones CD-1 que en los C57BL/6J. Sin embargo, la reducción del porcentaje de respuesta registrada en el hemisferio dañado frente a un estímulo ipsilateral, fue menos acusada en ambas cepas de ratón (**Tabla 4.13.**).

Tabla 4.13. Porcentaje de actividad ipsilateral residual en animales infartados C57BL/6J y CD-1, con respecto a la situación basal (pre-infarto).

		% Respuesta ipsilateral	
		C57BL/6J	CD1
Hemisferio derecho (Dañado)	S ₁ FL	43.98 ± 4.96	75.51 ± 1.23
	m ₁ CFL	45.60 ± 4.90	68.37 ± 0.93
Hemisferio izquierdo (Intacto)	S ₁ FL	33.58 ± 8.81	13.23 ± 1.65
	m ₁ CFL	31.24 ± 7.15	18.05 ± 0.98

Los datos se muestran como la media ± EEM de 2 experimentos independientes, con un total de 12 animales por cepa de ratón.

En resumen, el análisis comparativo sugiere que ambas cepas de ratón compartieron ciertas similitudes pero también diferencias importantes en la actividad evocada de la corteza somatosensorial y motora. En situación basal (pre-infarto), la estimulación contralateral de la extremidad delantera provocó un potencial de campo en la correspondiente representación somatosensorial (S₁FL), pero también se originó con cierto retraso una activación en la representación motora (m₁CFL). La máxima activación se produjo con un intervalo de latencia cercano a los 4 ms entre S₁FL y m₁CFL, y ambas respuestas correlacionaron entre sí, indicando que ambas representaciones están funcionalmente conectadas. Esta correlación también se mantuvo en el hemisferio intacto una semana después del infarto en ambas cepas de ratón. Por otro lado, la abolición de respuesta contralateral en el hemisferio infartado, en S₁FL y m₁CFL, fue mucho más marcada en los ratones CD-1. Con todo, aunque en nuestro modelo de daño cerebral (dMCAO), el infarto afectó a la corteza somatosensorial S1 de forma similar en ambas cepas de ratón, los ratones CD-1 presentaron infartos de mayor extensión y menor variabilidad, mayor consistencia en los déficits sensorimotrices examinados con el test de la rejilla y profunda abolición de actividad evocada en el hemisferio afectado. En virtud de estos hallazgos se consideró conveniente validar la eficacia terapéutica de las MSC/P integradas en el biomaterial en los ratones de la cepa CD-1, motivo de estudio en el siguiente objetivo de esta tesis.

4.4. Evaluación de la eficacia terapéutica del implante de células madre mesenquimales integradas en geles de fibroína.

El estudio de la eficacia terapéutica de las MSC encapsuladas en los geles de fibroína (SF-MS) se realizó empleando el modelo de infarto cerebral caracterizado en el objetivo anterior (objetivo 3). Las MSC fueron trasplantadas en el caudado-putamen (estriado), región anteriormente utilizada para validar la bioseguridad y compatibilidad de los hidrogeles de fibroína con la función cerebral (objetivo 1), así como la supervivencia y retención de las células trasplantadas integradas en el material (objetivo 2). Tal y como se discutió previamente, en una gran variedad de estudios con modelos animales de daño cerebral esta región (estriado) ha sido empleada para albergar el trasplante de distintos tipos de células terapéuticas; solas o integradas con biomateriales de diferente forma y composición ([Aebischer et al 1994](#), [Bible et al 2012b](#), [Inden et al 2005](#), [Liang et al 2013](#), [Nisbet et al 2009](#), [Tresco et al 1992](#), [Yang et al 2009a](#)).

En el ratón, el estriado está muy próximo a dos áreas cerebrales con actividad neurogénica, en concreto la zona subventricular (SVZ) y el giro dentado del hipocampo (DG) ([Darsalia et al 2005](#), [Jin et al 2004](#), [Ming & Song 2011](#), [van Praag et al 2002](#)). Inicialmente, en nuestro estudio se planteó la posibilidad de que el implante de MSC y su prolongada supervivencia y retención en el tejido cerebral, favorecida por su integración en los geles de fibroína, pudiera producir una fuente continua de factores neurotróficos, capaces de estimular la actividad neurogénica y la restauración de la función cerebral perdida tras el infarto cerebral ([Hsieh et al 2013](#), [Jeong et al 2014](#)).

Varios fueron los motivos por los que las MSC fueron implantadas 72 horas después del infarto cortical. En distintos estudios con modelos animales se ha demostrado que aquellos genes que contribuyen al crecimiento neuronal, a los mecanismos de sinaptogénesis, al crecimiento axonal o a la expansión del número de espinas dendríticas, son las que más fuertemente se activan durante un periodo de tiempo limitado tras el daño cerebral, generalmente unos pocos días ([Li et al 2015](#), [Murphy & Corbett 2009](#)). Las evidencias actuales sostienen que existe una ventana temporal óptima para la neuroplasticidad post-ictus, durante la cual es posible intervenir terapéuticamente logrando la máxima recuperación funcional posible. Por ejemplo, ratas con daño cerebral sometidas a rehabilitación temprana durante la primera y segunda semanas después del ictus, mostraron una recuperación funcional significativa y un mayor número de ramificaciones dendríticas en neuronas de la corteza respecto a aquellas ratas que comenzaron su rehabilitación un mes después del ictus, donde no se produjo mejoría funcional ni crecimiento dendrítico alguno ([Biernaskie et al 2004](#)). Además, estudios previos sugieren que el patrón de revascularización cerebral endógena tras la inducción de un daño, tiene su máxima expresión al cabo de 3 días ([Taguchi et al 2004](#)). La acción terapéutica de las MSC ha sido relacionada con revascularización del tejido lesionado ([Hsuan et al 2016](#)), como consecuencia de la liberación de diversos factores con actividad angiogénica como el VEGF, el PIGF, el bFGF el PDGF-BB y el TGF- β ([Aranguren et al 2011](#), [Bao et al 2011](#), [Pelacho et al 2007](#)), promoviendo una reducción del territorio cerebral

dañado y una mejor recuperación funcional al ser trasplantadas intranasal o intracerebralmente durante las primeras 72 horas tras la inducción del infarto ([Mora-Lee et al 2012](#), [van Velthoven et al 2013](#)). Por otro lado, en una gran mayoría de estudios previos, el trasplante con células madre de diverso origen se ha realizado en las primeras horas-días tras el daño cerebral ([Andres et al 2011](#), [Bao et al 2011](#), [Mora-Lee et al 2012](#), [Wang et al 2016b](#))

Por todo lo expuesto anteriormente se consideró adecuado realizar el trasplante intracerebral de las MSC integradas en fibroína en las primeras 72 horas post-ictus. La evaluación de la eficacia terapéutica se realizó mediante la estrategia experimental descrita en la **Figura 4.39.** en la que se incluyeron tres grupos distintos de animales en función del tratamiento: i) ratones inyectados con PBS; ii) inyectados con MSC solas; iii) e inyectados con MSC embebidas en una solución de fibroína previamente sonicada. En los tres grupos de animales se empleó el test de la rejilla para la examinar la evolución temporal de la coordinación sensorimotora en respuesta al tratamiento. También se realizó el registro electrofisiológico de la actividad provocada en regiones infartadas (S_1FL) y peri-infartadas (m_1CFL) de la corteza cerebral en los mismos animales y a lo largo de las semanas post- tratamiento, concluyendo con el sacrificio de los animales y el análisis histológico de las secciones cerebrales (plano coronal) obtenidas (**Figura 4.39.**).

Figura 4.39. Abordaje experimental para evaluar la eficacia neuro-terapéutica de las células madre y progenitores mesenquimales (MSC) encapsulados en geles de fibroína. En este estudio se dividieron los animales infartados en 3 grupos en función del tratamiento. Tras el infarto (tiempo 0), a todos los animales se les inyectó en el estriado (72 horas post-infarto) un volumen equivalente de solución salina/PBS (grupo control), de MSC en PBS (grupo MSC) y de MSC integradas en fibroína (grupo SF-MSC). La evaluación de la coordinación sensorimotora (test de la rejilla) se realizó en condiciones basales (antes del infarto; -72 h) y a distintos tiempos post-infarto; antes (48-72 horas) y durante varias semanas después del tratamiento (las flechas rojas señalan las semanas de aplicación del test). En el mismo punto temporal (72 horas post-infarto) de inyección de PBS, MSC o SF-MSC, se implantaron electrodos para el registro de la actividad evocada (PE) en la corteza somatosensorial (campo representativo S_1FL ; "core" del infarto, electrodo azul) y motora (m_1CFL ; área peri-infartada/intacta, electrodo verde). Los registros de actividad evocada fueron obtenidos durante varias semanas post-isquemia (flechas azules). En la parte superior se muestran dibujos de tres secciones coronales para ilustrar el área de trasplante estriatal de las MSC, en relación al implante multi-electrodo en la corteza somatosensorial y motora de ambos hemisferios y con respecto al área infartada (área coloreada en rojo pálido). A la finalización de dicho estudio (diez semanas post-infarto) los animales previamente tratados se sacrificaron, se extrajeron sus cerebros y se valoró histológicamente la extensión y localización del área dañada.

Siguiendo este esquema experimental, a las 72 horas post-ictus se realizaron (mismo día) dos cirugías consecutivas; una para la inyección estriatal de los distintos tratamientos y otra para la colocación de los electrodos de registro en las cortezas somatosensorial (S_1FL) y motora (m_1CFL). Por tanto, a diferencia de la metodología usada en el tercer objetivo de esta tesis, en este caso el implante de los electrodos de registro se realizó tras el infarto cerebral. Este abordaje metodológico permitió un mayor control de la inyección de los distintos tratamientos en términos de las coordenadas estereotáxicas, principalmente en el eje dorso-ventral (eje Z), que no hubiera sido posible si el implante de los electrodos de registro (inmovilizados con cemento dental cubriendo toda la extensión de la bóveda craneal) o de una cánula (a través de la cual tentativamente podrían haberse inyectado los distintos tratamientos) se hubieran realizado antes del infarto cerebral. Esto excluyó la posibilidad de registrar la actividad evocada en los mismos animales antes y después del infarto, actividad que fue muy reproducible entre animales no infartados (**Figura 4.37. sección resultados objetivo 3**), y cuyos resultados (pre-ictus) fueron usados como valores de referencia en este estudio. Por el contrario, el test de la rejilla sí que fue aplicado en los mismos animales antes y después del ictus, como medio para demostrar la existencia de déficits post-infarto y su evolución temporal durante la posible recuperación funcional. La distribución de los animales empleados para el desarrollo de este estudio se muestra en la **tabla 4.14**.

Tabla 4.14. Número y distribución de animales infartados en función del tratamiento. Se indican los animales utilizados en cada punto temporal para la evaluación de la coordinación sensorimotora (test de la rejilla), el registro de la actividad cortical evocada y el análisis histológico.

	grupos	Iniciales (n)	Semanas post-infarto									
			1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a
Registro de PEs (N=3)	PBS	9	8	8	8	8	8	8	5	4	3	3
	MSC	9	9	9	6	6	6	6	6	6	6	6
	SF-MSC	9	9	9	7	7	7	7	7	7	7	7
Test de coordinación sensorimotora (N=3)	PBS	9		8		8		7		6		6
	MSC	9		9		9		8		8		8
	SF-MSC	9		9		9		9		8		8
Histología (N=3)	PBS	9										6
	MSC	9										8
	SF-MSC	9										8

Un total de 27 animales fueron utilizados en 3 estudios independientes. La mortalidad a lo largo de las semanas fue del 33,3% en los animales inyectados con el PBS y del 11,1% en los animales trasplantados con las MSC en solución o integradas en los hidrogeles de fibroína. Los criterios de inclusión/exclusión de los distintos animales para los estudios electrofisiológicos y el test funcional se encuentran definidos en la sección de materiales y métodos de esta tesis.

4.4.1. La mejoría funcional post-infarto fue exclusiva de los animales implantados con MSC integradas en geles de fibroína.

El análisis de la coordinación sensorial y motora se realizó empleando el test de la rejilla (**Figura 4.40.**), que de acuerdo a nuestros resultados previos resultó ser un test bastante eficaz para la detección de déficits sensorimotores a largo plazo tras la inducción del infarto cortical (**Figura 4.29. B**, ([Barrios et al 2016](#))). Con este test, en las primeras 48-72 horas tras el infarto, antes del tratamiento, los tres grupos de animales mostraron respecto a sus valores basales (pre-infarto), un aumento considerable del número de fallos cometidos con la pata contralateral al hemisferio infartado (pata afectada).

Figura 4.40. Recuperación parcial de la función sensorimotora en animales infartados implantados con MSC integradas en fibroína. Porcentaje de fallos (test de la rejilla) con la pata delantera contralateral al hemisferio dañado (A) e intacto (B) en ratones infartados inyectados con PBS (círculos blancos), MSC en PBS (círculos grises) o MSC encapsuladas en fibroína (círculos negros). En (A), nótese el marcado incremento del % de fallos a las 48 horas post-infarto (24 horas anteriores al inicio del tratamiento, flecha gris), denotando la existencia de déficits sensorimotores severos en los 3 grupos de animales que confirman la existencia de daño en la corteza somatosensorial, como consecuencia del infarto producido. En (B) por el contrario, tras el infarto no se observó un aumento de los déficits sensorimotores con la pata contralateral al hemisferio no afectado en ninguno de los grupos explorados. En A, nótese como el grupo de animales inyectados con las MSC encapsuladas (SF-MSC) muestra un progresivo menor número de fallos con el test funcional, alcanzando diferencias significativas con los otros dos grupos (PBS y MSC) a partir de la sexta semana post-tratamiento. Considerando exclusivamente la evolución temporal del grupo SF-MSC, tras una primera fase de recuperación gradual (fase I) se observó una mejoría substancial en los animales que resultó estadísticamente significativa respecto al valor pre-tratamiento (48 h post-infarto) a partir de la sexta semana (fase II). Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes con un mínimo de 9 animales por grupo (PBS, MSC y SF-MSC) y punto temporal. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre el grupo SF-MSC y el resto de grupos para cada punto temporal. Para el grupo SF-MSC las almohadillas muestran diferencias significativas con respecto a los valores pre-tratamiento (48 h post-infarto) (ANOVA de dos factores seguido por el test de Tukey; * $p < 0.05$).

Tras el tratamiento, los animales trasplantados con las MSC solas (**círculos grises**) o inyectados con el PBS (**círculos blancos**) mantuvieron relativamente constante el porcentaje de fallos, no observándose una mejoría significativa respecto a los valores obtenidos en las primeras horas tras el infarto (48-72 horas), previo al tratamiento (**Figura 4.40. A**). Únicamente en el grupo de animales tratados con las MSC integradas en los hidrogeles de fibroína (**círculos negros**), se observó una reducción progresiva del porcentaje de fallos cometidos con la pata afectada,

indicando la gradual recuperación de la coordinación sensorial y motora en este grupo de animales, recuperación progresiva que se produjo en dos fases. Durante las primeras cuatro semanas post-tratamiento (**Fase I**), los ratones presentaron una paulatina disminución del porcentaje de fallos sin alcanzar diferencias significativas con el resto de grupos o respecto a los valores post-infarto/pre-tratamiento. Sin embargo, a partir de la sexta semana, la recuperación fue mucho más marcada (**Fase II**) y significativa sobre el resto de grupos o respecto a la situación pre-tratamiento. En cualquier caso, respecto a los valores basales, la recuperación funcional de este grupo de animales fue incompleta. Por otro lado, tal y como se esperaría de los resultados obtenidos en el tercer objetivo de esta tesis, a lo largo del tiempo de estudio los fallos cometidos con la pata contralateral al hemisferio intacto, permanecieron relativamente constantes en todos los grupos ensayados (**Figura 4.40. B**), con valores muy reducidos y cercanos a los obtenidos antes de la inducción del infarto.

Paralelamente se examinó en los tres grupos de animales la actividad cortical provocada en respuesta a un estímulo eléctrico en el nervio mediado de ambas extremidades delanteras. Tal y como se describió en el tercer objetivo de esta tesis, el registro de los potenciales evocados contralaterales en el hemisferio dañado (**Figura 4.41. A**) se realizó de manera simultánea en regiones de la corteza cerebral correspondientes a los campos representativos sensorial (S_1FL ; **trazados azules**) y motor (posición más caudal) (m_1CFL ; **trazados verdes**) de la pata delantera. A lo largo de las 10 semanas de estudio, los animales que fueron trasplantados con las MSC solas (**círculos grises**) o inyectados con PBS (**círculos blancos**) presentaron una abolición prácticamente completa de respuesta evocada tanto en la corteza somatosensorial (**Figura 4.41. B; panel i**) como en el área motora (**panel ii**). De hecho, los valores de amplitud evocada fueron inferiores al umbral de detección ($10\mu V$), por lo que los datos mostrados en la **Figura 4.41.** se obtuvieron como un promedio del valor del potencial registrado en torno a los valores de latencia esperados (*ver sección materiales y métodos*). Por el contrario, el grupo de animales trasplantados con las MSC integradas en la fibroína (**círculos negros**), se caracterizó por una reducida pero cuantificable actividad evocada en ambas representaciones corticales, exhibiendo valores de amplitud siempre inferiores a los registrados en animales no infartados (valores de referencia; **línea discontinua azul**), pero significativamente superiores a los animales infartados tratados con PBS o con MSC solas.

Figura 4.41. La recuperación parcial de la coordinación sensorimotora exclusiva de los animales tratados con MSC encapsuladas en los geles de fibroína, se relacionó con una mayor actividad evocada residual en el cortex somatosensorial y motor del hemisferio dañado. (A) Ilustraciones representando la colocación de los electrodos de registro en la corteza somatosensorial S₁FL (electrodo azul) y motora m₁CFL (electrodo verde) con respecto a la pata contralateral estimulada. Se muestran el hemisferio registrado en una situación previa (pre-infarto; panel izquierdo) y durante las semanas posteriores a la inducción del infarto (panel derecho). En la situación post-infarto se representa el área infartada en color rojo pálido. Registros de referencia de los potenciales evocados registrados en la corteza somatosensorial S₁FL y motora m₁CFL en animales no infartados (izquierda: registros de referencia) y en los tres grupos de animales ensayados a lo largo de varias semanas post-infarto y tratamiento (derecha). En los registros, las líneas negras se corresponden con el valor promedio de actividad evocada mientras que el EEM está representado por un sombreado en color verde o azul en función del campo cortical registrado. (B) Amplitud absoluta de respuesta evocada en S₁FL (panel i) y m₁CFL (panel ii) en el hemisferio dañado a lo largo de varias semanas post-infarto, en ratones inyectados con PBS (círculos blancos), MSC en PBS (círculos grises) o MSC encapsuladas en fibroína (círculos negros). La línea azul discontinua en ambos paneles representa el valor promedio de amplitud absoluta evocada en la corteza somatosensorial (S₁FL, panel i-izquierda) y motora (m₁CFL, panel ii-derecha) en animales no infartados (valores de referencia obtenidos del objetivo 3; figura 4.37; N=2; n=12). Los datos en (B) se muestran como la media ± EEM de 3 experimentos independientes con 9 animales al comienzo del estudio (ver tabla 4.11). Los asteriscos en color negro indican diferencias significativas entre los animales implantados con MSC encapsuladas con respecto a los inyectados con PBS o MSC en PBS. No se encontraron diferencias significativas entre los animales inyectados con PBS y MSC en PBS. Los asteriscos en color azul indican diferencias significativas exclusivamente entre el grupo de ratones SF-MSC y los animales inyectados con PBS (ANOVA de dos factores seguido por el test de Tukey; *p<0.05).

Figura 4.42. Exploración de la excitabilidad cortical en el hemisferio intacto de ratones infartados tratados con MSC encapsuladas en fibroína. (A) Ilustraciones representando la colocación de los electrodos en la corteza somatosensorial S₁FL (electrodo azul) y motora m₁CFL (electrodo verde), con respecto a la pata contralateral estimulada. Se muestran el hemisferio registrado en una situación previa (pre-infarto; panel izquierdo) y durante las semanas posteriores a la inducción del infarto (panel derecho). En la situación post-infarto se representa el área infartada en rojo pálido. Registros crudos promediados de los potenciales evocados registrados en la corteza somatosensorial S₁FL y motora m₁CFL en animales no infartados (izquierda: registros de referencia) y en los tres grupos de animales ensayados a lo largo de varias semanas post-infarto y tratamiento (derecha). En los registros, las líneas negras se corresponden con el valor promedio de actividad evocada mientras que el EEM está representado por un sombreado en color verde o azul en función del campo cortical registrado. (B) Amplitud absoluta de respuesta evocada en S₁FL (panel i) y m₁CFL (panel ii) en el hemisferio intacto a lo largo de varias semanas post-infarto, en ratones inyectados con PBS (círculos blancos), MSC en PBS (círculos grises) o MSC encapsuladas en fibroína (círculos negros). En ambos paneles la línea azul discontinua representa el valor promedio de amplitud absoluta evocada en la corteza somatosensorial (S₁FL, panel i-izquierda) y motora (m₁CFL, panel ii-derecha) en animales no infartados (valores de referencia obtenidos del objetivo 3; figura 4.37; N=2; n=12). Los datos en (B) se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes con 9 animales al comienzo del estudio (ver tabla 4.11). Las almohadillas señalan la existencia de diferencias significativas entre el grupo de animales implantados con MSC solas y los valores de referencia de animales no infartados (ANOVA de dos factores seguido por el test de Tukey; #p<0.05). No se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos de animales tratados.

Por otro lado, también se examinó la actividad de la corteza somatosensorial (S_1FL ; **trazados azules**) y motora (m_1CFL ; **trazados verdes**) en el hemisferio no afectado o intacto (**Figura 4.42.**). En el grupo de ratones SF-MS (círculos negros), los valores de amplitud evocada en ambas representaciones corticales fueron moderadamente superiores a la respuesta evocada registrada en ratones no infartados (referencia, **línea discontinua azul**), sugiriendo la existencia de fenómenos discretos de hiperexcitabilidad que no alcanzaron sin embargo diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores de referencia o respecto a los otros dos grupos de animales ensayados. Por el contrario, en los animales inyectados con PBS (**círculos blancos**) o tratados con las MSC solas (**círculos grises**), la actividad evocada en la corteza somatosensorial (S_1FL) se mantuvo relativamente constante y próxima a los valores de referencia, mostrando un ligero incremento de actividad durante las últimas semanas de estudio, especialmente en el grupo de ratones inyectados con PBS, pero sin presentar relevancia significativa. En el caso de la actividad registrada en el cortex motor (m_1CFL) de este hemisferio, en ambos grupos de animales (**panel ii; PBS: círculos blancos; MSC: círculos grises**) se observaron valores de amplitud ligeramente superiores a los registrados en situación basal pre-infarto (**línea discontinua azul**), mostrando únicamente significancia estadística en semanas discretas del ensayo, y exclusivamente en el grupo de animales tratados con MSC solas.

Complementariamente se examinó el intervalo de latencias entre las máximas respuestas provocadas (onda N1) en la región somatosensorial (S_1FL) y motora (m_1CFL) de ambos hemisferios. En relación al hemisferio infartado, la casi total ausencia de respuesta evocada en los animales tratados con las MSC solas o inyectados con el PBS, impidió determinar el intervalo de latencia en este hemisferio. En el caso de los animales implantados con las MSC integradas en fibroína el intervalo de latencia entre ambas respuestas corticales (**Figura 4.43. A**) fue ligeramente inferior a los valores de referencia (**línea discontinua azul**). Concretamente, en puntos discretos (semanas 6 y 7) correspondientes a la segunda fase de recuperación detectada con el test de la rejilla (**Fase II**), se observó una reducción considerable del intervalo de respuesta entre S_1FL y m_1CFL , alcanzando valores próximos a cero y estadísticamente inferiores a la latencia determinada para los animales no infartados, sugiriendo en este caso que durante la **Fase II** la respuesta generada en m_1CFL no fue dependiente de la actividad previa en S_1FL . Por el contrario, el intervalo de latencias entre S_1FL m_1CFL examinado en el hemisferio intacto (**Figura 4.43. B**), se mantuvo en todos los grupos analizados en valores cercanos a los obtenidos en ratones no infartados (**línea discontinua azul**)

Figura 4.43. Análisis del intervalo de respuestas evocadas entre S₁FL y m₁CFL a lo largo del tiempo post-infarto. Intervalos de latencia entre las respuestas evocadas en m₁CFL y S₁FL tras la estimulación contralateral en el hemisferio dañado (panel A) e intacto (panel B), en los animales inyectados con PBS (círculos blancos), MSC en PBS (círculos grises) o MSC encapsuladas en fibroína (círculos negros). La línea discontinua azul muestra el intervalo de latencia promedio entre las respuestas registradas en m₁CFL y S₁FL en ratones no infartados obtenidos de los hemisferios derecho (panel A) e izquierdo (panel B) (datos extraídos del objetivo 3, tabla 4.7.; N=2; n=12). Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes con 9 animales al comienzo del estudio (ver tabla 4.14). (ANOVA de dos factores, seguido por el test de Tukey; *p<0.05).

4.4.2. La recuperación de la función sensorimotora en los animales implantados con MSC integradas en fibroína se relacionó con fenómenos de remodelación cerebral en áreas peri-infartadas.

Un hallazgo interesante del grupo de animales tratados con SF-MSC fue la evolución temporal de la relación m₁CFL / S₁FL con dos fases distintas en función de las semanas post-tratamiento (**Figura 4.44. A**). Durante las primeras cinco semanas, cuando no se observó una recuperación funcional significativa en el test de la rejilla (**Fase I, Figura 4.40**), la relación m₁CFL/ S₁FL se mantuvo relativamente constante y ligeramente superior a los valores de referencia obtenidos de los animales no infartados (**línea discontinua azul**), aunque sin alcanzar diferencias significativas. Sin embargo, un aumento progresivo y significativo del ratio m₁CFL / S₁FL se observó en las últimas semanas tras el tratamiento (**Figura 4.44. A, línea roja**), exactamente cuando la recuperación sensorimotora fue más marcada y significativa en el grupo de animales SF-MSC con respecto a los otros dos grupos ensayados (**Fase II, Figura 4.40**).

La progresiva elevación del ratio m₁CFL/S₁FL fue el resultado de una gradual reducción de actividad en S₁FL paralelamente a un incremento de la capacidad de respuesta en m₁CFL (**Figura 4.45**). Por el contrario, no se observaron cambios en la relación m₁CFL / S₁FL en el hemisferio intacto de este grupo de ratones (**Figura 4.44. B**), con valores similares, en cada punto temporal post-tratamiento, a la situación pre-infarto (línea azul discontinua). Estos hallazgos sugieren la existencia de anomalías en la conectividad funcional entre ambos campos representativos

Figura 4.44. Relación de respuestas evocadas en la corteza somatosensorial y motora de animales implantados con MSC encapsuladas en geles de fibroína. (A) Relación de amplitudes entre las respuestas evocadas en la corteza motora (m_1CFL) y área somatosensorial (S_1FL) en el hemisferio derecho/dañado (panel A) e izquierdo/intacto (panel B), tras el estímulo contralateral. Se representa el % de respuesta evocada en m_1CFL respecto a la actividad generada en S_1FL . En ambos paneles la línea discontinua en color azul representa el mismo parámetro (% de respuesta m_1CFL) obtenido para los hemisferios derecho (panel A) e izquierdo (panel B) en ratones no infartados (datos extraídos del objetivo 3; tabla 4.8.; N=2; n=12). En el hemisferio infartado (panel A), se indica en color rojo el aumento marcado y progresivo de la relación m_1CFL/S_1FL . Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes con 9 animales al comienzo del estudio (ver tabla 4.14). Los asteriscos muestran la existencia de diferencias significativas entre animales infartados (grupo SF-MSC) y no infartados (valores de referencia; línea azul discontinua) (ANOVA de dos factores, seguido por el test de Tukey, * $p<0.05$).

m_1CFL y S_1FL del hemisferio infartado, cuando la recuperación funcional se está produciendo de forma significativa en este grupo de animales (**Fase II**). Esta afirmación esta basada en dos evidencias. Primero, la progresiva reducción de la latencia calculada entre las máximas respuestas registradas en m_1CFL y S_1FL y segundo, el incremento progresivo de la relación m_1CFL / S_1FL en el hemisferio infartado respecto al hemisferio intacto o respecto al valor calculado para ambos hemisferios en ratones no infartados (**línea azul discontinua**).

Figura 4.45. Evolución temporal de la respuesta evocada en S_1FL y m_1CFL en animales tratados con MSC encapsuladas en fibroína. Curso temporal de la actividad registrada en S_1FL (panel A) y en m_1CFL (panel B) en ratones individuales (mostrados en diferente color) durante la segunda y décima semanas post-tratamiento. Nótese como en el 100% de los animales estudiados la respuesta provocada en el área somatosensorial S_1FL disminuyó en el intervalo temporal analizado, mientras que un 70% de estos mismos animales mostraron un aumento progresivo de respuesta en el área motora m_1CFL .

Figura 4.46. Estudios de correlación entre la actividad evocada registrada en m_1CFL y S_1FL en los hemisferios intacto y dañado en animales implantados con MSC integradas en fibroína. Correlación de Pearson entre la amplitud contralateral en m_1CFL y S_1FL del hemisferio dañado (panel A) e intacto (panel B). Se muestra la correlación en las dos fases de recuperación observadas (fase I: semana 1 a 5; fase II: semana 6 a 10). Exclusivamente durante la Fase II se observó una falta de correlación significativa entre las respuestas registradas en el hemisferio dañado (panel A).

La pérdida progresiva de conectividad funcional entre las regiones m_1CFL y S_1FL del hemisferio infartado pudo ser corroborada cuando se analizó la correlación existente entre las máximas repuestas evocadas en ambos campos representativos. Primeramente, cuando consideramos exclusivamente el hemisferio intacto, de manera similar a lo determinado en la situación pre-ictus (Tabla 4.10.), en los tres grupos de ratones ensayados se observó una correlación positiva entre las respuestas registradas en ambas regiones, independientemente de las dos fases de destreza sensorimotora (Figura 4.46. B; Tabla 4.15.). Por otro lado, no se halló ninguna relación entre estas respuestas y el porcentaje de fallos cometidos con la pata afectada (Tabla 4.16.), indicando que el grado de activación detectado en el hemisferio intacto no guardó ninguna relación con la evolución temporal de los déficits sensorimotores determinados por el porcentaje de fallos de la pata afectada, contralateral al hemisferio infartado.

Tabla 4.15. Correlación entre la actividad evocada registrada en m_1CFL y S_1FL en los hemisferios intacto y dañado en animales tratados con PBS, MSC solas y MSC integradas en fibroína.

			Fase I	Fase II
Hemisferio dañado		PBS	No determinado (**)	
		MSC		
		SF-MSC	$r = 0.64; p < 0.01$	$r = 0.34; p = 0.28$
Hemisferio intacto		PBS	$r = 0.48; p < 0.01$	$r = 0.32; p < 0.05$
		MSC	$r = 0.46; p < 0.01$	$r = 0.58; p < 0.01$
		SF-MSC	$r = 0.72; p < 0.01$	$r = 0.42; p < 0.05$

Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes, con un total de 9 animales por grupo. En fondo verde se indican aquellas condiciones donde la correlación alcanzó mayor significancia estadística. ** No se pudieron realizar estudios de correlación para el hemisferio infartado en los ratones inyectados con PBS o con MSC solas, dado que en la mayoría de los animales la magnitud de las corrientes registradas fue inferior a 10 μV con valores de actividad provocada por debajo del umbral de detección.

Segundo, en el hemisferio infartado, se obtuvo una correlación significativa entre las respuestas evocadas en m_1CFL y S_1FL exclusivamente durante la **Fase I** pero no durante la **Fase II** de recuperación sensorimotora (**Figura 4.46. A; Tabla 4.15.**). Además, mientras que durante la **Fase I** el porcentaje de fallos con la pata afectada correlacionó con las respuestas registradas en ambos campos corticales (**Tabla 4.16.**), durante la **Fase II**, solamente las respuestas registradas en m_1CFL correlacionaron moderadamente con los déficits sensorimotrices (**Tabla 4.16.**).

Tabla 4.16. Correlación entre la amplitud de respuesta evocada en la corteza somatosensorial S_1FL o motora m_1CFL con respecto a los déficits funcionales (test de la rejilla).

			Fase I	Fase II
Hemisferio dañado	S_1FL	PBS	No determinado (**)	
		MSC		
		SF-MSC	$r = -0.74; p < 0.01$	$r = 0.12; p = 0.61$
	m_1CFL	PBS	No determinado (**)	
		MSC		
		SF-MSC	$r = -0.76; p < 0.01$	$r = -0.39; p = 0.09 (\#)$
Hemisferio intacto	S_1FL	PBS	$r = -0.18; p = 0.49$	$r = -0.14; p = 0.59$
		MSC	$r = -0.21; p = 0.44$	$r = 0.28; p = 0.33$
		SF-MSC	$r = -0.05; p = 0.82$	$r = -0.08; p = 0.71$
	m_1CFL	PBS	$r = 0.19; p = 0.52$	$r = -0.52; p = 0.16$
		MSC	$r = 0.40; p = 0.13$	$r = 0.57; p = 0.15$
		SF-MSC	$r = -0.09; p = 0.76$	$r = 0.32; p = 0.24$

Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes, con un total de 9 animales por grupo. En verde se marcan las correlaciones con significancia estadística. En fondo verde se indican aquellas condiciones donde la correlación alcanzó mayor significancia estadística.

** No se pudieron realizar estudios de correlación con el hemisferio dañado en los ratones inyectados con PBS o con MSC sólo, dado que en la mayoría de los animales la magnitud de las corrientes registradas fue inferior a 10 μV con valores de actividad provocada por debajo del umbral de detección,

En resumen, nuestros resultados sugieren que la recuperación funcional significativa observada en las últimas semanas post-tratamiento (**Fase II**) y exclusiva del grupo de ratones implantados con MSC integradas en fibroína se relacionó con una falta de conectividad funcional entre m_1CFL y S_1FL en el hemisferio dañado. Durante la **Fase II**, la respuesta generada en m_1CFL en respuesta a la estimulación de la pata delantera, no dependió nunca más de la respuesta previa en S_1FL , indicando que el campo motor m_1CFL representó la información sensorial aferente de la pata delantera. En esta condición, la actividad generada en m_1CFL correlacionó moderadamente con los déficits sensorimotrices, indicando que la actividad sensorial emergente en la región peri-infartada del campo m_1CFL fue responsable, en parte, de la progresiva recuperación funcional observada en los animales tras el tratamiento.

4.4.3. La acción terapéutica de las MSC integradas en los hidrogeles de fibroína se relacionó con un efecto neuroprotector y posiblemente anti-inflamatorio.

A lo largo del estudio, una cuestión que resultó intrigante fue identificar el mecanismo o mecanismos responsables para: i) la preservación parcial y mantenida de la actividad somatosensorial que fue observada desde las primeras horas tras el implante de MSC encapsuladas en fibroína (**Figura 4.41**) y ii) los fenómenos de reorganización del cortex motor anteriormente descritos y asociados a la generación de una actividad sensorial emergente tardía en zonas peri-infartadas correspondientes al campo representativo m_1CFL (**Figura 4.44.**).

Una vez sacrificados los animales, se realizó el estudio histológico del cerebro de los tres grupos de animales participantes mediante tinción con azul de toluidina.

Diez semanas después del tratamiento, los animales trasplantados con las MSC solas (**Figura 4.47. A y B; círculos y barra gris**) o inyectados con PBS (**círculos y barra blanca**) mostraron en el hemisferio afectado y en relación al hemisferio intacto, un aumento considerable del territorio subcortical, que denota la aparición de edema subcortical probablemente asociado a una inflamación crónica. Por el contrario, los animales implantados con las MSC integradas en fibroína (**círculos y barra negra**), se caracterizaron por presentar valores de inflamación subcortical cercanos al 0% a lo largo de todas las secciones analizadas.

Adicionalmente observamos como el volumen del territorio cortical perdido tras el daño isquémico, fue significativamente menor en el grupo de animales SF-MSC (**Figura 4.47. C; círculos y barra negra**), respecto a los ratones trasplantados con las MSC solas (**círculos y barra gris**) o inyectados con PBS (**círculos y barra blanca**). Estudios previos han determinado que el trasplante de MSC dos días después de la inducción del infarto cortical, produce una reducción consistente del tejido cerebral dañado examinado 1 mes post-transplante ([Mora-Lee et al 2012](#)), justificando el papel neuroprotector de las MSC, en este caso favorecido por la inclusión de esta población celular en los geles de fibroína, ya que la inyección de MSC solas no supuso una ventaja selectiva para reducir el tamaño de infarto o el edema cerebral respecto a los ratones inyectados con PBS. La reducción del volumen de infarto podría explicar en parte la preservación parcial de actividad somatosensorial observada en los ratones SF-MSC, siendo este fenómeno, probablemente, un prerrequisito para la aparición tardía de fenómenos de remodelación cerebral, tal y como se discutirá a continuación.

Figura 4.47. El tratamiento con MSC encapsuladas en fibroína produjo una menor pérdida de tejido cortical. (A) Imágenes representativas de secciones coronales teñidas con Nissl (-1 mm anterior a bregma) correspondientes a la región de mayor extensión del infarto cortical causado en nuestro modelo de estudio (dMCAO). De izquierda a derecha se muestran secciones correspondientes a 2 animales representativos de cada grupo ensayado. Las líneas de puntos delimitan las regiones corticales y subcorticales basándose en el atlas estereotáxico de Paxinos y Franklin (Paxinos & Franklin 2004), ilustrando tanto el edema subcortical observado en los animales tras 10 semanas post-tratamiento, así como el tejido cortical perdido por el daño isquémico. (B) Inflamación subcortical tras 10 semanas de tratamiento en función de la sección coronal analizada con respecto a bregma (panel i) o considerando la totalidad del cerebro (panel ii). (C) Tejido cortical perdido tras 10 semanas de tratamiento en función de la sección coronal analizada con respecto a bregma (panel i) o considerando la totalidad del cerebro (panel ii). Los datos se muestran como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes con un mínimo de 6-8 animales por grupo. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre el grupo de ratones SF-MSC con los otros dos grupos ensayados, PBS o MSC solas (t-test student; * $p < 0.05$).

V. DISCUSIÓN

5.1. Hidrogeles de fibroína de la seda en intervención neurorestaurativa

5.1.1. Compatibilidad y tolerabilidad del biomaterial integrado en el tejido cerebral.

Por su elevada flexibilidad y resistencia, la seda comenzó a utilizarse originariamente como material de sutura para todo tipo de intervenciones, sin embargo, la existencia de repuesta inflamatoria en algunos pacientes, suscitó dudas sobre la posible alergenicidad de los dos polímeros que componen la seda: sericina y fibroína ([Thurber et al 2015](#)). Los estudios de inmunoreactividad de ambos polímeros por separado, confirmaron que por sí solos no causaban reacciones alérgicas ([Wohlrab et al 2012](#), [Yang et al 2015](#)) y que la moderada respuesta inflamatoria observada en los pacientes podía ser adscrita al uso de la seda en su forma nativa (sericina:fibroína). ([Thurber et al 2015](#)). La fibroína constituye el 70% de la seda en los capullos de *Bombyx mori* ([Inoue et al 2000](#)). Su nula inmunogenicidad, debido a la carencia de motivos peptídicos en su secuencia aminoacídica ([Zhou et al 2001](#)) reconocibles por las células del sistema inmunológico, y la versatilidad de formatos en los que la fibroína puede ser reconstituida ([Thurber et al 2015](#)), hace de este biomaterial un candidato idóneo para múltiples aplicaciones biomédicas. Ha sido empleada como soporte estructural y/o funcional para el crecimiento de distintas estirpes celulares, incluyendo MSCs ([Calabrese & Kaplan 2012](#), [Ferri et al 2016](#), [Floren et al 2016](#), [Luan et al 2006](#), [Sun et al 2016](#)), fibroblastos ([Minoura et al 1995a](#)), osteoblastos ([Tong et al 2016](#), [Varkey et al 2015](#)), condrocitos ([Kambe et al 2010](#)), e incluso poblaciones de linaje neural como, neuronas ([Roloff et al 2014](#), [Sun et al 2015b](#)) células de Schwann ([Hu et al 2012](#), [Schuh et al 2016](#)) o astrocitos ([Qu et al 2013](#)), extendiéndose también su uso como vehículo para la liberación de moléculas y diversos factores terapéuticos ([Cao et al 2017](#), [Ebrahimi et al 2017](#), [Li et al 2017](#), [Yang et al 2017](#)) .

El primer objetivo alcanzado en esta memoria fue el desarrollo de un hidrogel-inyectable de gelificación retardada para trasplante intra-cerebral. Ajustando los parámetros de sonicación y la concentración de la fibroína, se consiguió que la aplicación de dos pulsos consecutivos de ultrasonidos sobre el polímero en solución, condujera a su gelificación *in vitro* en un tiempo aproximado de 10-15 min, lo que favoreció el trasplante del biomaterial en estado pre-gel (estado fluido), y su posterior gelificación *in situ*, minimizando el daño tisular, requisito deseable en un biomaterial de aplicación intra-cerebral ([Nih et al 2016](#)). El tiempo de gelificación del biomaterial una vez trasplantado *in vivo* no fue analizado, sin embargo la localización de los depósitos del biomaterial a distintos tiempos post-trasplante cerca de la zona del implante (*ver sección resultados 4.1.2. figura 4.2.*), sugiere que la formación del hidrogel en el interior del parénquima cerebral, tuvo lugar en una ventana temporal cercana a la observada *in vitro*. Esto es así puesto que un mayor tiempo de gelificación podría haberse relacionado con un mayor grado de dispersión

del biomaterial por el tejido, identificándose múltiples depósitos de fibroína en regiones alejadas al implante. Consideramos que la localización del implante en la región de interés, el cuerpo estriado, resultó adecuada para conseguir el efecto terapéutico buscado. En nuestro modelo de daño, el estriado se localiza peri-lesionalmente, y cercano al SVZ (nicho neurogénico en el cerebro adulto), siendo nuestra hipótesis de trabajo, que una mayor supervivencia de las MSCs al ser integradas en los hidrogeles, favorecería una secreción continuada de factores neurotróficos, consiguiendo así estimular la neurogénesis endógena del tejido, lo que podría favorecer mecanismos de plasticidad y/o la integración de nuevas neuronas en los circuitos dañados la recuperación funcional de los animales. Otra corriente ideológica sostiene que una mejor localización para el trasplante terapéutico es en la región lesionada, donde tras la muerte celular se origina una cavidad, lo que permite aceptar un mayor volumen del biomaterial y/o infusión celular, sin inducir daño tisular adicional ([Clarkson et al 2010](#), [Moshayedi et al 2016](#), [Overman et al 2012](#), [Zhong et al 2010](#)). Sin embargo, el implante en el interior de la cavidad isquémica, podría impedir la restitución de la representación original dañada o incluso la remodelación de áreas peri-lesionadas. Además, dado que en la cavidad infartada se presenta un ambiente altamente hostil, podría hacer fracasar la viabilidad de las células trasplantadas ([Savitz et al 2004](#)) a diferencia de cuando son trasplantadas en regiones adyacentes ([Kelly et al 2004](#)), donde la supervivencia del injerto es altamente superior. Por otro lado, el trasplante intra-estriatal de células madre no sólo ha sido empleado en estudios pre-clínicos de ictus ([Darsalia et al 2007](#), [Mora-Lee et al 2012](#)), sino también en modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson ([Bjorklund et al 2002](#), [Effenberg et al 2015](#), [Nakaji-Hirabayashi et al 2013](#)), Huntington ([Reddington et al 2014](#)) o Alzheimer ([Nagahara et al 2009](#)), y dado que el objetivo de la caracterización de los hidrogeles de fibroína no sólo estriba en su uso en terapia neurorrestaurativa en el ictus, el análisis de su biocompatibilidad tras su implante en el estriado (caudado-putamen), permite estudiar las posibles interacciones de este material con la intrincada red neuronal/axonal presente en esta compleja estructura cerebral ([Yang et al 2009a](#)), obteniendo así una visión completa sobre el grado de inflamación/toxicidad potencial, y su posible aplicación en otros modelos de enfermedades neurodegenerativas, así como el estudio de los posibles déficits en la coordinación sensorimotora de los animales, como se relatará a continuación.

En cuanto a las propiedades mecánicas del hidrogel obtenido (módulo elástico), fueron similares a las descritas para el cerebro de roedores (*ver sección resultados 4.1.1. tabla 4.2*). La mecanosensibilidad celular se reconoce como un actor importante en la fisiología y la patología celular/tisular, acompañando y/o contribuyendo en procesos patológicos ([Georges et al 2007](#), [Zhao et al 2010](#)). La mayoría de las células, incluidas las células gliales y las neuronas, son mecanosensibles y responden a estímulos mecánicos de su entorno ([Moshayedi et al 2014](#), [Zhang et al 2015b](#)), pudiendo participar éstos, en la diferenciación de células madre ([Engler et al 2007](#)), guiando la migración axonal ([Gilmour et al 2004](#)), o en la activación de la respuesta inmune ([Lam et al 2014](#), [Moshayedi et al 2014](#)). Moshayedi y col., analizaron el grado de respuesta inflamatoria

derivada del implante intra-cortical en estado previo de gel de ácido poliacrílico (PAA), al cabo de 1 y 3 semanas. Observaron como aquellos hidrogeles que presentaban valores alejados al módulo elástico del tejido cerebral, promovían un incremento en la activación de la microglía (CD11b) y en la presencia astrocitaria (GFAP) ([Moshayedi et al 2014](#)). Lam y col., describieron un fenómeno similar, pero en esta ocasión trasplantaron intra-estriatalmente soluciones de ácido hialurónico (HA) para su gelificación *in situ* ([Lam et al 2014](#)). Dos semanas después del implante, identificaron una mayor presencia de células astrocitarias (GFAP⁺) en aquellos animales trasplantados con hidrogeles de mayor módulo elástico, sin embargo en esta ocasión no detectaron un incremento en la microglía (Iba1⁺) en función del grado de rigidez del biomaterial. Es por ello que la obtención de un hidrogel con propiedades elásticas comparables a las del tejido cerebral, fue requisito esencial para el desarrollo del presente trabajo de tesis. En nuestro caso no estudiamos los efectos de la rigidez del hidrogel de fibroína trasplantado en el estriado de los ratones, sin embargo la inflamación detectada al cabo de 2 semanas post-implante del hidrogel seleccionado como adecuado para el trasplante (2% p/v), fue similar a la observada en el grupo de animales inyectados con PBS, sugiriendo que ni el grado de rigidez, ni la presencia de la fibroína en sí, indujo respuestas inflamatorias crónicas ni de relevancia más allá de las primeras 72 horas.

La reducida bio-respuesta tisular asociada al implante de fibroína, ha sido descrita con anterioridad empleando distintos formatos de este biomaterial en diversos tejidos distintos al cerebral. Por ejemplo, el implante intramuscular de films de fibroína sobre los que se cultivaron previamente MSC, produjo una menor infiltración de macrófagos hacia los depósitos del material en relación al implante de films de colágeno o ácido poli-láctico (PLA), ([Meinel et al 2005](#)). De forma similar, en piel ([Guan et al 2010](#)) y en huesos largos (tibia y húmero) ([Uebersax et al 2013](#)), se observó una menor reacción inflamatoria hacia la fibroína que hacia los films de alcohol poli-vinílico (PVA) ([Uebersax et al 2013](#)). Empleada como fibra en la reparación de nervio ciático en ratas, el reclutamiento de macrófagos en la vecindad del injerto de fibroína, fue similar a la infiltración presente tras el injerto de nervio autólogo ([Guan et al 2010](#)), así como cuando ha sido empleada en la reparación de heridas en la mucosa bucal en ratas, tanto en formato de film como de andamio poroso, se ha observado una reducida respuesta inflamatoria (células CD45⁺) ([Ge et al 2012](#)).

Centrándonos en el tejido cerebral, Kim DH y col., diseñaron un formato de fibroína soluble para mejorar la conductividad de una matriz de electrodos y realizar el registro crónico de la actividad evocada visual en la corteza cerebral de gatos ([Kim et al 2010a](#)). Cuatro semanas después del implante de los electrodos, y tras la solubilización de la fibroína para mejorar el contacto de los electrodos con el tejido cerebral, examinaron cortes coronales del cerebro de los animales trasplantados con tinción hematoxilina/eosina (HE), y no observaron una agregación celular de consideración, lo que identificaron como ausencia de respuesta inmune. Un año más tarde Kim DW y col., emplearon “films” de fibroína en ratas craneotomizadas como soporte para la reconstrucción de una duramadre artificial. Tras el implante, los niveles de moléculas pro-

inflamatorias como IL-6, IL-1 β o TNF- α , ciclo-oxigenasa-2 (COX-2) fueron significativamente inferiores a los detectados tras el injerto de una duramadre artificial basada en colágeno ([Kim et al 2011](#), [Wang et al 2008a](#)). Por otro lado, Chan y col., en un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer determinaron la existencia de gliosis reactiva (detección de astrocitos; células GFAP positivas) en respuesta al implante intra-ventricular de fragmentos peptídicos de fibroína ([Cha et al 2017](#)). Por último, en otro ejemplo, destaca el trabajo de Tang-Schomer y col., en el que se describe la obtención de interfaces neurona-electrodo basados en films de fibroína para la estimulación crónica de la superficie cortical ([Tang-Schomer et al 2014a](#)). Para testar la compatibilidad de la fibroína en este formato, los ratones empleados fueron craneotomizados y sobre la superficie cortical expuesta se colocaron films de fibroína. El análisis de la respuesta inflamatoria en el tejido, reveló una presencia de células astrocitarias (GFAP⁺) similar a la de los animales control, en los que únicamente se realizó una craneotomía ([Tang-Schomer et al 2014a](#)). Estas evidencias enfatizan el carácter pobremente inmunogénico e inflamatorio de este biomaterial en el tejido cerebral.

Mediante estudios inmunohistoquímicos y de microscopía electrónica, se ha demostrado que la simple inyección intracerebral de una solución salina es suficiente para desencadenar una bio-repuesta de tipo inflamatorio, acompañada de la muerte de poblaciones celulares, en el parénquima cerebral adyacente a la inyección ([Lam et al 2014](#), [Yang et al 2009a](#)). La bio-respuesta transitoria observada en nuestro estudio debe estar probablemente relacionada con el procedimiento quirúrgico tan aparentemente invasivo como es la introducción de una aguja, aunque sea de forma breve, en el territorio cerebral. En nuestro estudio el diámetro de la aguja no fue superior 0,260 mm. Aunque diámetros menores podrían conducir a un menor daño tisular reduciendo ambos efectos (inflamatorio y citotóxico), también podrían limitar la eficacia del procedimiento al incrementar la mortalidad de las células trasplantadas que son sometidas a una mayor tensión superficial, y a atravesar conductos de menor diámetro ([Aguado et al 2012](#), [Lam et al 2014](#)), disminuyendo así el efecto terapéutico deseado. Es por tanto, que la elección de la aguja así como los parámetros de inyección deben de ser seleccionados cuidadosamente para minimizar los daños derivados de la cirugía y administrar tantas células viables como sea posible ([Carmichael 2008](#)). En cuanto a la supervivencia observada en el grupo de animales implantados con el biomaterial, ésta fue superior al 90 % y similar al grupo de animales inyectados con solución salina (PBS). La reducida mortalidad, se restringió a las primeras 72 horas post-trasplante y se atribuyó al propio procedimiento quirúrgico. En resumen, la tolerabilidad de los hidrogeles de fibroína implantados fue razonable, puesto que a las dos semanas post-implante no se observaron respuestas inflamatorias o de muerte celular de consideración, siendo similares en ambos grupos de animales (implantados con fibroína o PBS).

Una observación interesante de nuestro estudio fue la reducción progresiva del tamaño de los depósitos de fibroína en función del tiempo post-trasplante. En un estudio previo, la activación del sistema inmune fue considerada mayoritariamente responsable de la degradación de matrices de

fibroína implantadas intra-muscularmente en ratas inmuno-deficientes y nativas ([Wang et al 2008b](#)). Después de 8 semanas tras el implante, Wang y col., observaron un progresivo incremento del tamaño de poro en las matrices de fibroína cuando éstas fueron implantadas en ratones silvestres respecto al implante en animales inmuno-deficientes, sugiriendo que los macrófagos del sistema inmune de los animales silvestres contribuyeron a degradar progresivamente el biomaterial. En otro ejemplo, en el estudio de Szybala y col., se emplearon microesferas porosas de fibroína para la liberación de fármacos antiepilépticos en un modelo de epilepsia en ratas ([Szybala et al 2009](#)). Tras el trasplante intra-estriatal de las microesferas de fibroína en la fisura infra-hipocampal, observaron un incremento progresivo en el tamaño de los poros de las microesferas implantadas, lo que identificaron como una degradación parcial de este formato de fibroína ensayado. Por el contrario, la corriente ideológica más aceptada por diferentes autores es atribuir la degradación de la fibroína *in vivo*, a la acción proteolítica de diferentes proteasas presentes en los distintos tejidos ([Balakrishnan & Banerjee 2011](#), [Thurber et al 2015](#), [Wang et al 2008b](#)). En concreto, la quimiotripsina C (caldecrina), ha sido identificada en el cerebro de ratas ([Tomomura et al 2002](#)), y en estudios *in vitro* se ha demostrado que esta proteasa puede degradar un 70 % de la fibroína tras dos semanas de incubación ([Li et al 2003](#)). Con ciertas limitaciones, el curso temporal y la magnitud de la degradación parcial de fibroína determinado *in vitro*, fue similar al observado en nuestros estudios *in vivo*. Los productos de degradación de la fibroína por la acción proteolítica de la quimiotripsina C son principalmente aminoácidos: glicina, alanina, aspártico, glutámico, lisina y arginina ([Li et al 2003](#)), que pueden ser eliminados del organismo sin producir reacciones inmunológicas de relevancia o toxicidad celular ([Thurber et al 2015](#)), unas observaciones compatibles con la ausencia de muerte celular y/o inflamación en las últimas semanas post-trasplante de nuestro estudio, coincidiendo con la máxima degradación de la fibroína. Aunque en nuestro estudio no se examinaron los mecanismos responsables de la progresiva degradación de los depósitos de fibroína, nuestros hallazgos son incompatibles con una degradación del material mayoritariamente inducida por la activación de microglía y leucocitos periféricos, dado que la máxima reducción del volumen de los depósitos de fibroína ocurrió entre la segunda y cuarta semana post-trasplante (*ver sección resultados 4.1.2. Figura 4.2.*), un intervalo de tiempo caracterizado por la ausencia de poblaciones celulares de tipo inflamatorio en las condiciones ensayadas (*ver sección resultados 4.1.2. Figura 4.3.*). En ingeniería de tejidos la degradabilidad de los biomateriales es un requisito deseable ([Nair & Laurencin 2007](#)), para una vez obtenido el efecto terapéutico deseado, el polímero sea eliminado del tejido. Sin embargo los periodos de reparación de los distintos tejidos suelen ser variables, por lo que las tasas de degradación de los biomateriales ensayados deben de poder ajustarse a los requisitos de cada aplicación ([Lu et al 2011](#)). En nuestro caso, la tasa de degradación de los hidrogeles de fibroína fue adecuada para conseguir el efecto terapéutico logrado en esta tesis doctoral.

En nuestro trabajo el implante de fibroína se realizó en el estriado. Tal y como se describió en la sección de resultados, los núcleos caudado y putamen forman parte del estriado dorsal, el

principal componente de los ganglios basales. La corteza, el estriado y el tálamo constituyen un circuito conectado anatómicamente y funcionalmente (cortico-estriado-tálamo-cortical), en el que el flujo de información en bucles o “*loops*” especializados permiten el procesamiento de la información sensorimotora procedente de áreas específicas del cortex y a través del tálamo, también por conexiones específicas, devuelve la información procesada a las áreas corticales, actuando así como centro integrador de la información cognitiva y motora ([Alexander et al 1990](#), [Alexander et al 1986](#), [DeLong & Wichmann 2009](#)).

En cuanto a la contribución del estriado a la integración de la información sensorial y motora, ésta se relaciona con su papel en la modulación de la actividad cortico-espinal, que a través de proyecciones aferentes excitatorias, modula la actividad cortical vía proyecciones talámicas. ([Sippy et al 2015](#)). Así, el estriado junto con el cerebelo son considerados centros moduladores del control motor, ya que controlan y modulan la actividad motora que se inicia en la corteza facilitando los movimientos voluntarios, desde su planificación hasta su terminación, pasando por la ejecución y coordinación. Por tanto, es tal la implicación del estriado en varias funciones de integración cerebral, que cualquier posible daño en esta región necesariamente debería manifestarse en anormalidades del procesamiento sensorimotor y cognitivo. Por ejemplo, en pacientes con la enfermedad de Parkinson, caracterizada por presentar daño neuronal adscrito principalmente al estriado, los síntomas se asocian mayoritariamente con deterioros en el sistema locomotor, sin embargo, también se encuentra bien establecido que presentan déficits sensoriales de relevancia ([Hillen & Sage 1996](#), [Koller 1984](#), [Snider et al 1976](#)). En modelos animales de la enfermedad de Parkinson, la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la vía nigroestriada se asoció con alteraciones en el equilibrio y la coordinación motora que fueron examinados empleando los mismos tests de comportamiento que en nuestro estudio; el test del cilindro y de la rejilla ([Fleming et al 2013](#), [Pothakos et al 2009](#)). En 2009, Choi y col., demostraron cómo la inyección intraestriatal de lipopolisacárido (LPS), indujo una fuerte respuesta inflamatoria microglial, que condujo a la muerte y degeneración de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra ([Choi et al 2009](#)), presentándose déficits sensorimotores en los animales examinados mediante el test de la rejilla y el rotarod. Por otro lado, la mera inyección de mediadores pro-inflamatorios en el cuerpo estriado (prostaglandina D2 y el agonista A2 del tromboxano), y la consecuente activación de la microglía, provoca el deterioro en el comportamiento motor de animales ([Costall et al 1985](#), [Yagami et al 2004](#)). Dado que más allá de las primeras 72 horas post-trasplante no observamos déficits de comportamiento con ambos tests funcionales, no parece probable que los depósitos de fibroína en el estriado estén originando daños en esta estructura o en regiones adyacentes, que puedan comprometer el flujo de información sensorimotora (ver sección resultados 4.1.3. Figura 4.5. D, panel ii), sino que la escasa biorespuesta tisular observada en esas primeras horas sea la causante de los déficits en la coordinación sensorimotora de los animales, examinados mediante el test de la rejilla. Aun cuando el estriado no parece jugar papel alguno en modular la transmisión de información sensorial a nivel talamo-cortical, contrariamente

se han obtenido evidencias en pacientes y animales que avalan el papel del estriado en dicha modulación. Por ejemplo, en pacientes de Huntington, la neurodegeneración afecta especialmente a las neuronas del estriado durante las fase iniciales de la enfermedad, propagándose en estados intermedios y avanzados a otras estructuras cerebrales ([Vonsattel et al 1985](#)). Es durante esta fase inicial cuando la mayoría de los pacientes muestran un incremento anormal de la latencia en los potenciales evocados somatosensoriales ([De Tommaso et al 2011](#)) así como una reducción de la amplitud de los mismos ([de Tommaso et al 2016](#)). Así, aunque ningún componente de la onda evocada por el estímulo sensorial es generada en el estriado ([Valeriani et al 2009](#)), la disminución en la respuesta sensorial evocada se relaciona con déficits en la integración sensorimotora a nivel de este ganglio basal ([Abbruzzese & Berardelli 2003](#)). En concordancia con estos hallazgos, en un modelo animal de la enfermedad de Huntington, inducido mediante la inyección unilateral de ácido quinolónico, se produjo la destrucción selectiva de neuronas en el estriado y en paralelo una disminución de la amplitud de la respuesta somatosensorial evocada del hemisferio inyectado ([Schwarz et al 1992](#)). En nuestro estudio, al cabo de un mes post-implante no se detectaron anomalías en la latencia y amplitud de los potenciales evocados somatosensoriales generados en ambos hemisferios en los animales implantados con el biomaterial, sugiriendo que los depósitos de fibroína presentes en el estriado no interfieren con la transmisión e integración sensorial. Por otro lado, se ha propuesto tanto en humanos como en animales incluyendo primates y roedores, que la activación del hemisferio del mismo lado (ipsilateral) a la extremidad estimulada, depende mayoritariamente de la activación previa del hemisferio contralateral a la extremidad estimulada, y que a través de proyecciones interhemisféricas que recorren en cuerpo calloso (CC) ([Gonchar et al 1995](#)), se produce la activación de regiones homólogas y no homólogas en el hemisferio opuesto ([Allison et al 1989](#), [Brus-Ramer et al 2009](#), [Gonzalez et al 2004](#)). Un porcentaje de la activación ipsilateral, también puede ser explicada por la presencia de proyecciones ipsilaterales desde el tracto espino-talámico y el núcleo lemnisco medial, hacia la corteza somatosensorial ([Wree et al 2005](#)). En línea con la presencia inocua de la fibroína sobre el estriado, tampoco se observaron en nuestro trabajo alteraciones en los potenciales ipsilaterales, y la conectividad entre ambos hemisferios en respuesta a un estímulo sensorial no resultó modificada.

La participación del estriado en la consolidación de ciertas formas de memoria, fue propuesta por Cohen y Squire, indicando en sus estudios que la memoria en humanos se clasificaba en dos sistemas anatómicos y funcionalmente distintos como son el hipocampo y el estriado ([Cohen & Squire 1980](#)). Estudios posteriores de imagen por resonancia magnética funcional (fMRI) en humanos y roedores, han establecido que existen interacciones recíprocas entre ambas regiones cerebrales ([Poldrack & Packard 2003](#)) cooperando entre sí en la adquisición de ciertas formas de memoria como es la memoria espacial ([Albouy et al 2013](#), [Leisman et al 2014](#)), encargada de registrar la información sobre el entorno y regular la orientación espacial permitiendo planear tareas de reconocimiento ([Kessels et al 2001](#)). En modelos animales, se ha observado que daños

en el estriado afectan a ciertas formas de memoria espacial, y que estas anormalidades pueden ser detectadas mediante tests de comportamiento como el laberinto en Z y en Y ([Gengler et al 2005](#)). En nuestro estudio, un mes posterior al trasplante, los animales implantados con la fibroína realizaron el test del laberinto en Y sin presentar defectos en su ejecución, en relación a los déficits sustanciales encontrados en el modelo animal de Alzheimer (5XFAD), con profunda alteración de la memoria espacial tal y como ha sido descrito con anterioridad ([Oakley et al 2006](#), [Wei et al 2016](#)). El estriado es una estructura cerebral clave para el aprendizaje motor ([Packard & Knowlton 2002](#)), puesto que recibe aferencias de la corteza frontal y parietal y posee aferencias en los núcleos del tálamo y en las áreas corticales implicadas en el movimiento ([Sippy et al 2015](#)). Así, generalmente los pacientes de Huntington muestran grandes dificultades para aprender conductoras motoras asociadas a un determinado estímulo ([Collins et al 2015](#), [Lawrence et al 2000](#)), enfatizando la importancia de esta estructura en el aprendizaje procedimental y en la adquisición de hábitos ([Packard & Knowlton 2002](#)). Sin embargo, en nuestro estudio, el aprendizaje motor examinado con el test de la rejilla no resultó visiblemente alterado en los animales trasplantados con la fibroína, dado que la ejecución semanal de este test produjo una progresiva reducción del porcentaje de fallos cometidos con ambas extremidades delanteras contralaterales a los hemisferios intacto e inyectado. Previamente este test ha sido utilizado para determinar alteraciones motoras en animales con lesiones en el estriado ([Chao et al 2012](#), [Kim et al 2010b](#)). En nuestro caso, el normal aprendizaje motor observado es coherente con la ausencia de una posible lesión estriatal causada por la inyección previa del biomaterial o por la presencia de los depósitos de fibroína en esta estructura cerebral.

Por último cabe destacar la implicación de esta estructura subcortical en la regulación del ciclo vigilia-sueño ([Qiu et al 2010](#)). La composición neuronal del cuerpo estriado es heterogénea ([Yelnik et al 1997](#)), compuesta en un 95% por neuronas espinosas medianas (NSM), llamadas así por su elevado contenido en espinas dendríticas. Durante el sueño de ondas lentas, las NSM disparan de forma sincronizada junto con neuronas piramidales corticales, a diferencia de lo que sucede durante la vigilia donde no se produce esta sincronización cortical ([Kasanetz et al 2006](#), [O'Donnell & Grace 1995](#)). Mena-Segovia y col., indujeron un daño citotóxico en el estriado de ratas mediante la infusión de ácido kaínico lo que originó un incremento en la vigilia de los animales, aumentando su locomoción durante los ciclos de oscuridad a los 7 días post-lesión, y produciendo modificaciones en el patrón del sueño durante los ciclos de luz ([Mena-Segovia et al 2002](#)). Los trastornos en los patrones del sueño, fueron observados 30 días después de la inducción del daño estriatal, aunque en este punto temporal no se detectó una hiperactividad locomotora. Las alteraciones observadas en el ciclo vigilia-sueño, podrían producirse por la interrupción de la conectividad cortico-estriatal-talámica-cortical, o bien ser consecuencia de la pérdida de regulación del núcleo tegmental que posee un papel importante en la regulación del sueño REM y la vigilia a través de proyecciones colinérgicas al tálamo ([Kodama & Honda 1999](#)). En un modelo de Parkinson inducido por la inyección unilateral de 6-hidroxidopamina con deterioro de las neuronas

dopaminérgicas del nigroestriado, se identificó una disminución de potencia en las bandas α (7.6–12.5 Hz) y β 1 (12.6–17.5 Hz) en el estriado de ambos hemisferios, y sólo en el lesionado se incrementó la potencia en la banda β 2 (17.5–27.5 Hz) ([Vorobyov et al 2003](#)), sin embargo en su estudio no examinaron diferencias en el porcentaje de tiempo empleado en las distintas fases de sueño en estos animales, a diferencia de los estudios de Mena-Segovia y col., o el trabajo de Fisher y col., realizado sobre un modelo genético de la enfermedad de Huntington (R6/2) ([Fisher et al 2013](#)). Fisher y col., identificaron anomalías en el sueño a medida que se desarrolló la enfermedad, identificando una disminución del pico de amplitud del ritmo theta; (4–9 Hz) en estadios muy precoces (9 semanas). Por tanto, en la mayoría de los casos, lesiones en el estriado de roedores indujeron alteraciones cuantitativas en el EEG y/o fragmentación del sueño. Sin embargo, en nuestro trabajo, a pesar de la existencia de depósitos de fibroína un mes después del implante, tanto el porcentaje de tiempo empleado en cada estado conductual (vigilia, SWS y REM) como la densidad espectral de potencia fueron invariablemente similares entre los ratones implantados con el biomaterial, animales inyectados con solución salina y animales no inyectados.

Los hallazgos obtenidos durante la primera fase de nuestro estudio, muestran la versatilidad de los hidrogeles de fibroína para aplicaciones terapéuticas en trastornos del SNC. El estudio de la biorespuesta tisular (inflamación y muerte celular), así como de la función cerebral, examinada mediante pruebas de comportamiento y el análisis electrofisiológico de los animales tras el implante intraestriatal del biomaterial, demuestra la coexistencia benigna de la fibroína de la seda con el complejo circuitaría neuronal encargada de la coordinación sensorimotora, así como la regulación de la vigilia-sueño, el aprendizaje y la memoria, ofreciendo una prueba más de la biocompatibilidad de este material.

5.1.2. Estudios de compatibilidad entre MSC/P e hidrogeles de fibroína de la seda.

Los estudios de interacción biológica entre la fibroína y las células terapéuticas (MSC/P), fueron realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, empleando distintos formatos de fibroína. Cabe destacar, las diferencias observadas en el patrón e intensidad de adhesión de las MSC/P sobre los films de fibroína con respecto a diferentes proteínas de matriz extracelular, así como la morfología presentada por estas células al integrarse en los hidrogeles de fibroína.

La adhesión celular es esencial en la comunicación y regulación celular, resultando de vital importancia en el desarrollo y mantenimiento de los tejidos, puesto que las interacciones mecánicas entre una célula y su matriz extracelular (ECM) pueden influir y controlar el comportamiento y la función celular ([Khalili & Ahmad 2015](#)). *In vitro*, la viabilidad y el ciclo celular, así como la comunicación y regulación de las funciones celulares, dependen del anclaje firme al sustrato ([Huang & Ingber 1999](#)). Las células se adhieren a otras células o su matriz extracelular mediante sitios de unión, o proteínas transmembrana de anclaje. Estas proteínas transmembrana,

en su dominio extracelular reconocen secuencias aminoacídicas que desencadenan cambios estructurales que son transmitidos al dominio intracelular, el cual se encuentra en estrecho contacto con el citoesqueleto a través del complejo de adhesión focal (FA) ([Horwitz 1997](#)). Estos cambios estructurales, se traducen en cambios celulares tanto en condiciones fisiológicas, como patológicas ([Frenette & Wagner 1996](#)). Las integrinas son las proteínas de anclaje extracelular mayoritarias, aunque también pueden mediar uniones célula-célula, estando implicadas en la mecanotransducción de señales celulares ([Honarmandi et al 2011](#)), dirigiendo la migración, proliferación y diferenciación celular ([Fournier et al 2005](#), [van der Flier & Sonnenberg 2001](#)). Constituyen una superfamilia de glicoproteínas heterodiméricas ([Kaverina et al 2002](#)), compuestas por dos subunidades no covalentes denominadas alfa y beta ([Ruoslahti et al 1994](#)). Comúnmente, las integrinas de las MSC/P expresan hasta 10 subunidades tipo α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 10$, αV , αIIb) y hasta 4 tipo β ($\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$, y $\beta 5$), y la combinación de estas diferentes subunidades α/β permite el reconocimiento de distintas proteínas de matriz extracelular, como por ejemplo la laminina ($\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 5\beta 3$) o la fibronectina ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 5\beta 3$) ([Majumdar et al 2003](#)), ambas empleadas en nuestro estudio. Dicho reconocimiento se realiza mediante secuencias aminoacídicas o motivos de adhesión presentes en las proteínas extracelulares, como son los motivos RGD (Arginina-Glicina-Aspártico) ([Cutler & Garcia 2003](#)), PHSRN (prolina-histidina-serina-arginina-asparagina) ([Aota et al 1994](#)) o el RGDS (arginina-glicina,aspártico-serina) ([Pierschbacher & Ruoslahti 1984](#)), estos dos últimos, sólo presentes en la fibronectina ([Mas-Moruno et al 2016](#)). *In vitro* observamos como las MSC/P se adhieren con una menor eficacia inicial a los films de fibroína, con respecto al plástico de cultivo y a la laminina o fibronectina.

La expresión diferencial de las integrinas de superficie en las MSC/P y/o la presencia de diferentes motivos de adhesión en las proteínas de la matriz extracelular ensayadas, podría justificar las diferencias observadas en el curso e intensidad de adhesión de las MSC/P durante las primeras 24/72 horas. La ausencia de motivos de adhesión en la fibroína ([Zhou et al 2001](#)), que si están presentes en la laminina o la fibronectina, podría justificar las diferencias observadas tanto en el curso de adhesión como en la intensidad de las interacciones. Sin embargo, no justifica la ausencia de diferencias en el tiempo en el que las MSC/P se adhieren a la laminina con respecto a la fibroína, o las diferencias encontradas entre la fibronectina y la laminina. Las diferencias en el patrón de adhesión entre ambas proteínas extracelulares, podrían estar relacionadas con las concentraciones empleadas en nuestros estudios, puesto que se ha demostrado que a iguales o similares concentraciones de ambas proteínas se logra un mayor porcentaje de células adheridas sobre la fibronectina que sobre laminina ([Goodwin & Pauli 1995](#)). Otra posibilidad para explicar las diferencias encontradas podría estar atribuida a las diferencias en la secuencia peptídica de ambas proteínas ([Tseng & Mortensen 1989](#)). En cuanto a la ausencia de diferencias en el patrón de adhesión celular de las MSC/P a la fibroína y laminina, es posible que la utilización de suero bovino fetal en los ensayos, el cual contiene proteínas de adherencia, hormonas, nutrientes y factores de crecimiento entre otros ([Hemeda et al 2014](#)), o la secreción de proteínas de matriz

extracelular (ECM) a partir de las propias MSC/P ([Topoluk et al 2017](#)) hubiese podido interferir con los resultados obtenidos, al evaluar la adherencia de las células a las propias proteínas del suero ([Etxebarria et al 2017](#)), o a las secretadas por las MSC/P ([Topoluk et al 2017](#)).

Sin embargo, algunos autores defienden que la adherencia celular a la fibroína se produce de forma semi-específica ([Zhou et al 2001](#)), puesto que la interacción con el biomaterial se ha demostrado que desencadena y regula la expresión de diversas integrinas de membrana ([Sengupta et al 2010](#)). Concretamente, Sengupta S. y col., cultivaron MSC/P sobre “films” de fibroína e identificaron un incremento en la expresión de integrinas tipo $\alpha 2$, $\alpha 5$ y $\beta 1$. Las integrinas tipo $\alpha 2$ reconocen motivos GER (Glicina-glutámico-arginina), carentes en la fibroína ([Zhou et al 2001](#)), sin embargo las integrinas tipo $\alpha 5$ reconocen secuencias tipo RGD o RG“X” (siendo “X” un aminoácido hidrofóbico) ([Aota et al 1991](#)). Así, aunque en un bajo número, la fibroína contiene secuencias tipo RGY (arginina-glicina-tirosina) y RGV (arginina-glicina-valina) ([Zhou et al 2001](#)) a las que podrían tentativamente adherirse las integrinas $\alpha 5$ presentes en las MSC/P, pudiendo explicar las diferencias en el patrón e intensidad de adhesión observadas en nuestro estudio. Mientras que el reconocimiento de motivos de adhesión RGD (laminina) o RGY/RGV (fibroína), estaría mediado en ambos casos por integrinas tipo $\alpha 5\beta 1$, en el reconocimiento de los motivos RGD, PHSRN y RGDS (fibronectina) participarían una mayor variedad de integrinas $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 5\beta 3$, $\alpha 11\beta 1$ ([Mas-Moruno et al 2016](#)), que posiblemente contribuirían a una adhesión más eficaz durante las primeras horas de contacto entre las MSC/P con la fibronectina respecto al resto de proteínas ensayadas. En cuanto a la menor intensidad de adherencia de las MSC/P sobre fibroína se podría explicar en base a la reducida especificidad de unión entre las integrinas y los motivos RGY/RGV presentes en la fibroína ([Zhou et al 2001](#)) con respecto a los motivos RGD (laminina y fibronectina) y PHSRN/RGDS (fibronectina) presentes en el resto de proteínas de matriz extracelular ensayadas.

Aun cuando las MSC/P presentaron anomalías en la adherencia celular sobre fibroína, estas alteraciones no se tradujeron en modificaciones en el crecimiento celular, resultados compatibles con estudios previos donde se ha demostrado que la fibroína constituye un material estructuralmente compatible con la proliferación celular ([Wang et al 2006](#)). Hace más de dos décadas, Minoura y col., emplearon en sus estudios fibroblastos murinos y determinaron que en términos de proliferación, los “films” de fibroína eran comparables al colágeno ([Minoura et al 1995a](#), [Minoura et al 1995b](#)), si bien es cierto que atribuyeron parte de la adhesión celular a la presencia de sericina en las preparaciones. Años más tarde Gotoh y col., identificaron como los fibroblastos murinos cultivados sobre films de fibroína tanto en su forma nativa como modificados por la adición de residuos de arginina, exhibieron una adhesión y proliferación mayor en estos últimos ([Gotoh et al 1998](#)). Si bien es cierto que la adición de secuencias de unión específicas, como el RGD u otras secuencias presentes en la fibronectina, a la cadena peptídica de la fibroína ha demostrado que favorece la proliferación de MSC/P y osteoblastos ([Chen et al 2003a](#), [Sofia et al 2001](#), [Widhe et al 2016](#), [Wohlrab et al 2012](#), [Yang et al 2015](#)), en estudios *in vivo*, se ha

demostrado que el péptido de adhesión es ligeramente inmunogénico, traduciendo en un incremento de la degradabilidad del biomaterial y una mayor respuesta inmune del tejido trasplantado ([Yano et al 2003](#)). En este sentido, se ha sugerido que la existencia de secuencias peptídicas en la fibroína nativa ([Yamada et al 2004](#), [Zhou et al 2001](#)) que podrían ser reconocidas de forma semi-específica por las integrinas ([Hynes 1992](#)), pueden, aunque en menor medida, estimular mecanismos de proliferación celular ([Bai et al 2011](#), [Li et al 2012](#), [Li et al 2009b](#)). Los estudios de Yamada y col., identificaron como “films” de fibroína de base acuosa como los usados en nuestro estudio, promueven la proliferación de fibroblastos en condiciones estándar de cultivo ([Yamada et al 2004](#)). Mora-Martinez y col., cultivaron células mamarias humanas, (línea celular MDA-MB-231), empleando un medio condicionado con un 0.4% de fibroína o 0,05% de sericina, observando que ni la proliferación ni el ciclo celular se encontraron comprometidos ([Martinez-Mora et al 2012](#)). En nuestro caso, no observamos una disminuida proliferación de las MSC/P en contacto con la fibroína con respecto al crecimiento sobre plástico de cultivo, si bien es cierto que no exploramos si las células cultivadas sobre fibronectina y/o laminina, que presentan motivos de adhesión en su cadena peptídica, permiten un mayor incremento del crecimiento celular con respecto a la fibroína en formato de “film”. En cuanto a los estudios de viabilidad realizados sobre este formato de fibroína, al cabo de 8 semanas en cultivo, no identificamos una reducción en la viabilidad de las células cultivadas sobre los “films” de fibroína con respecto a cuando fueron cultivadas sobre el plástico de cultivo. Estas observaciones son compartidas por otros autores, que han evaluado la citotoxicidad a corto plazo (4-10 días) sin observar fenómenos de mortalidad/apoptosis relacionados con la presencia del biomaterial, empleando para ello tanto técnicas inmunocitoquímicas, como de citometría de flujo ([Rodriguez-Lozano et al 2014](#), [Yang et al 2015](#)). La integración de nanopartículas basadas en fibroína en el interior de células, como vehículo para la liberación de factores (VEGF), ha demostrado la citocompatibilidad de este material, preservando la viabilidad celular de fibroblastos, y una liberación sostenida durante al menos 3 semanas ([Kundu et al 2010](#)), confirmando el carácter compatible de este biomaterial con el cultivo celular.

Continuando con los estudios realizados *in vitro*, y al contrario de los resultados obtenidos con el formato de “film”, el análisis de la proliferación de las MSC/P integradas en los hidrogeles de fibroína indicó que esta población celular fue incapaz de expandirse en el periodo de tiempo estudiado (2 semanas de cultivo). Estos resultados no son compartidos por otros autores que observan, tras analizar el contenido de DNA en el interior de los hidrogeles al cabo de 10-20 días en cultivo, una reducida, pero existente proliferación de las MSC/P integradas en hidrogeles de fibroína ([Sun et al 2016](#), [Wang et al 2008a](#)). En los estudios de Wang y col., se emplearon hidrogeles con concentraciones crecientes de fibroína, y observaron como las MSC/P integradas en ellos, presentaron una morfología esferoide, que denotó defectos en la adhesión celular, al igual que en nuestro estudio. Sin embargo, este déficit en adhesión en su caso fue compatible con una reducida proliferación celular ([Wang et al 2008a](#)), observada en los primeros 5 días de cultivo,

tiempo tras el cual, el contenido en DNA permaneció invariable a lo largo del tiempo restante. Es posible, que la metodología empleada en nuestro ensayo, basada en diferencias en el patrón de absorción de la luz (XTT), no fuese adecuada o lo suficientemente precisa, como para denotar pequeños cambios en el contenido celular, imposibilitándonos identificar una limitada aunque existente proliferación celular.

Sin embargo, un aspecto de mayor relevancia y motivo de futuros estudios en nuestro laboratorio, es el análisis del secretoma de las MSC/P integradas en hidrogeles de fibroína, pues es en esta liberación de factores donde se asienta mayoritariamente la actividad terapéutica de las MSCs ([Gervois et al 2016](#), [Hsuan et al 2016](#), [Lees et al 2012](#)). En este sentido, Sun y col., pese a la limitada proliferación observada en su estudio, determinaron como el co-cultivo de MSC/P y células endoteliales (OEG) integradas en hidrogeles de fibroína nativos, favoreció la formación de estructuras angiogénicas *in vitro*, determinando la presencia inmunofenotípica de un marcador de superficie endotelial (CD31), únicamente en presencia de las MSC/P en el cultivo ([Sun et al 2016](#)). Otros autores han modificado la secuencia de peptídica de la fibroína añadiendo tropoelastina o poli-L-glutamato, observando como los cultivos de MSC/P además de sobrevivir hasta 4 semanas de estudio, permiten la diferenciación osteogénica en ellos ([Calabrese et al 2016](#)). Silvia y col., estudiaron la modulación del secretoma de las MSC/P al integrarse en hidrogeles de “Gellan glue”, hidrogeles compuestos por repeticiones de glucosa, ácido glucurónico y ramnosa, en comparación con hidrogeles de fibroína conjugados con el motivo de adhesión GRGDS presente en la fibronectina ([Silva et al 2013](#)). Observaron que no sólo los geles modificados, mejoraron la proliferación de las MSC/P, sino que también incrementaron su actividad metabólica. El medio extracelular obtenido de ambos cultivos, fue empleado sobre el cultivo primario de neuronas de hipocampo de ratas P4 (post-natal), observándose como el medio extracelular de las MSC/P cultivadas en el interior de los hidrogeles modificados, favoreció la proliferación de las NSCs. Del mismo modo un año antes Silvia y col., realizaron un estudio similar en el que se demostró como el secretoma de las células endoteliales en co-cultivo con NSCs, favoreció la proliferación de estas últimas, mediante la secreción de factores como: factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y neurotrofina 3 (NT-3) ([Silva et al 2012](#)). Basándonos en estas evidencias previas, podríamos inferir que la integración de las MSC/P en los hidrogeles de fibroína, no altera el secretoma de las mismas. En nuestro caso, aun no pudiendo confirmar dichas afirmaciones, los resultados obtenidos en la presente tesis, muestran no sólo un incremento de la viabilidad celular *in vivo* tras el implante intra-cerebral, sino además un efecto terapéutico tras su trasplante intra-estriatal en un modelo animal de infarto cortical, sugiriendo una actividad secretora por parte de las MSC/P capaz de promover una neuroprotección/neurorrestauración, co-existente con su integración funcional en los hidrogeles de fibroína.

Los estudios *in vivo*, muestran como la integración de las MSC/P-EGFP en hidrogeles de fibroína, favorece su supervivencia y viabilidad en el parénquima cerebral, al examinar mediante

fluorescencia, el contenido de esta población celular en secciones coronales de cerebro a distintos tiempos post-trasplante. Moloney y col., realizaron un ensayo para determinar la eficacia de este fenotipo celular en estudios de localización celular o “*tracking*” en tejidos ([Moloney et al 2010](#)). En su estudio, determinaron el contenido celular tras el trasplante intra-estriatal de MSC/P nativas y EGFP⁺, delimitando el área fluorescente de las MSC/P-EGFP o bien el área inmuno-reactiva que rodea a los implantes de células, empleando un anticuerpo anti-GFAP. Determinaron que la emisión de fluorescencia por las células EGFP⁺ era un signo inequívoco de viabilidad celular, al observar una colocación de fluorescencia EGFP y un marcador de muerte celular (TUNEL) únicamente en las primeras 24 horas post-trasplante. Utilizando el método de cuantificación indirecta para ambos fenotipos de MSC, no observaron diferencias significativas en cuanto al volumen del injerto ni a la supervivencia, indicando que la expresión de EGFP no afecta a la viabilidad de las MSC/P post-trasplante, siendo capaces de detectar dichas células viables hasta 42 días post-trasplante. Sin embargo, estos resultados no son compartidos por Coyne y col., que determinan como el implante de las MSC/P ya sean nativas o EGFP⁺ presenta un fuerte rechazo en el estriado de ratas más allá de 2 semanas post-trasplante ([Coyne et al 2007](#), [Coyne et al 2006](#)). Sugieren que el daño intrínseco al implante intra-cerebral activa la microglía del tejido huésped, sin embargo esta reacción es insuficiente en ambos fenotipos celulares como para inducir el rechazo completo en el tejido, por lo que achacan dicho rechazo a una reactividad intrínseca a las MSC/P, ya sea por la secreción de citoquinas o de proteínas de matriz extracelular, que incrementan la respuesta inflamatoria post-operatoria. Sin embargo, la inflamación intrínseca derivada del trasplante de MSC/P en el parénquima cerebral es motivo de controversia. Rossignol y col., detectaron como la mera inyección de una solución salina, indujo una leve infiltración de los linfocitos T, que no fue observada tras el trasplante de MSC/P, sugiriendo en su trabajo que estas células fueron capaces de inhibir en cierta medida la infiltración leucocitaria en el área de implantación, siendo capaces de detectar las MSC/P hasta 60 días post-implante ([Rossignol et al 2009](#)). Dicha afirmación se correlacionó con estudios in vitro, donde las MSC/P evitan la activación de linfocitos T ([Dazzi & Marelli-Berg 2008](#)), confirmando así el carácter inmunosupresor y antiinflamatorio de las MSC/P. En nuestro estudio, la pérdida progresiva de MSC/P-EGFP en el cerebro sano de ratones nativos silvestres (WT), podría explicarse por una fuerte reacción inmunológica frente a la proteína EGFP ([Cobacho et al 2009](#), [Stripecke et al 1999](#)), o por el fuerte rechazo inducido por las propias MSC/P trasplantadas ([Coyne et al 2007](#), [Coyne et al 2006](#)), y como su integración en los hidrogeles de fibroína, que actuarán como una posible barrera física por el reducido tamaño de poro presente en ellos (~100-200 nm), atenuaría el ataque de la respuesta inmune en el tejido huésped, favoreciendo su viabilidad y retención en la localización del implante. La reducida, pero progresiva pérdida del contenido celular trasplantado en el interior de los hidrogeles, podría ser explicado en base a la progresiva degradación del biomaterial por la acción de proteasas, tal y como se discutió con anterioridad, y que dejaría expuestas a las MSC/P-EGFP al microambiente cerebral.

Pese a esa reducida degradación, y consecuente pérdida del contenido celular, el incremento en la supervivencia de las células observado en nuestro estudio, ha sido reportado empleando: células embrionarias integradas en hidrogeles de ácido hialurónico ([Adil et al 2017](#)), agregaciones de células mesenquimales rodeadas de matrices de alginato ([Ho et al 2016](#)), NSCs-EGFP integradas en hidrogeles de poli-péptidos (DHC) ([Zhang et al 2015c](#)), entre otros ([Ballios et al 2015](#), [Chang et al 2012](#), [Jha et al 2015](#)). En estos estudios se sugieren varios mecanismos por los que se observa una mayor viabilidad del injerto cuando es integrado en el interior de matrices tridimensionales; (i) la pérdida de contactos célula-ECM y célula-célula tras el trasplante, podría inducir una apoptosis celular, algo que no sucede al ofrecerles un sustrato al que adherirse tras el trasplante; (ii) la barrera física aportada por el biomaterial impide el ataque inmune tras el daño quirúrgico derivado del trasplante (iii) un efecto paracrino de las propias células contenidas en el interior de los hidrogeles, que favorece su supervivencia. Es posible que una combinación entre los tres mecanismos propuestos, sea la encargada de favorecer una supervivencia de las MSC/P-EGFP a largo plazo en nuestros estudios, y que por tanto el incremento en la viabilidad de las MSC/P trasplantadas terapéuticamente, sea responsable de la recuperación parcial y progresiva exclusiva de los animales trasplantados con SF-MS.

5.2. Desarrollo de un modelo de infarto cerebral en el ratón.

En la investigación preclínica, la selección de un modelo animal adecuado resulta crítico para la evaluación e interpretación de los resultados del estudio ([Garcia-Bonilla et al 2011](#)). En nuestro caso, exploramos el efecto terapéutico de las MSC/P integradas en geles de fibroína en un modelo de ictus cerebral en ratón, inducido por oclusión quirúrgica mediante ligadura de la arteria cerebral media. La ligadura se realizó en posiciones alejadas respecto al círculo arterial cerebral (polígono de willis) y las ramas centrales anterolaterales, para provocar un infarto restringido exclusivamente al córtex cerebral (*Ver sección Material y Métodos 3.2.2.2*).

En la actualidad, los animales más comúnmente utilizados en investigación del ACV son los roedores, principalmente ratones, ratas y gerbos, en base a su bajo coste de adquisición y mantenimiento, así como la monitorización de la fisiopatología y el procesamiento de los tejidos de forma más simple ([Sommer 2017](#)), aunque también existen enfoques experimentales en animales de mayor tamaño como gatos, perros, cerdos y primates no humanos. La versatilidad de los ratones para la generación de transgénicos, es una ventaja añadida en el uso de estos animales, concretamente la cepa C57BL/6J. Un ejemplo de ello es el desarrollo de ratones hipertensos, propensos a sufrir un ACV de forma espontánea, presentando similitudes fisiopatológicas con el escenario clínico ([Bailey et al 2011](#)). Las ventajas y desventajas del uso de los distintos modelos para imitar el accidente cerebrovascular humano han sido ampliamente estudiados ([Braeuninger et al 2012](#), [Carmichael 2005](#), [Engel et al 2011](#), [Fan et al 2017](#), [Fukuda & del Zoppo 2003](#), [Macrae 2011](#), [Mergenthaler et al 2004](#), [Orset et al 2007](#), [Sozmen et al 2012](#)), observándose un mayor

correlato con la condición clínica en aquellos infartos con afectación focal. Existen modelos de isquemia focal permanente o transitoria (es decir, con restauración del flujo sanguíneo), que típicamente se obtienen mediante la oclusión de vasos empleando para ello, filamentos intraluminales, ganchos o agentes pro-trombóticos ([Carmichael 2005](#), [Macrae 2011](#), [Sozmen et al 2012](#)). En relación a otros modelos quirúrgicos de infarto cerebral en roedores (*ver sección introducción; tabla 1.5.*), como la fototrombosis ([Brown et al 2009](#), [Brown et al 2007](#), [Harrison et al 2013](#), [Lim et al 2014](#), [Lim et al 2012](#)), que produce pequeños infartos restringidos a una región, modelos de oclusión intraluminal, que presenta un elevado riesgo de hemorragia y una elevada tasa de mortalidad ([Macrae 2011](#)), el modelo oclusivo empleado en el desarrollo de la presente tesis doctoral (dMCAO), es considerado por muchos autores, como el mejor para imitar la forma más frecuente de ictus isquémico en el hombre obteniendo infartos altamente reproducibles y con afectación cortical ([Kuraoka et al 2009a](#), [Rosell et al 2013](#), [Thiyagarajan et al 2008](#), [Wang et al 2013](#), [Wang et al 2016b](#)). Esto es así, puesto que una gran mayoría de los ictus de tipo isquémico en pacientes no reperfundan espontáneamente ([Albers et al 2011](#)), o los tratamientos son ineficaces, originando oclusiones permanentes como la que se han pretendido reproducir con nuestro modelo.

En una primera fase del estudio se emplearon ratones de la cepa C57BL/6J en los que se evaluó a corto y largo plazo los efectos del infarto sobre la actividad sensorial y motora de los animales. Esta cepa (C57BL/6J), es con diferencia, una de las más empleadas en modelos de infarto cerebral en ratones, estando justificado su uso en base al elevado número de ensayos realizados en ratones modificados genéticamente sobre este fondo genético ([Macrae 2011](#)). Sin embargo, en otros muchos casos, no existen razones de peso que justifiquen la elección de esta cepa concreta, salvo el hecho de que los ratones C57BL/6J son universalmente utilizados como modelos de diferentes patologías ([Bartoszewicz et al 1995](#), [Miller et al 2005](#), [Mitrovic et al 1991](#), [Oakley et al 2006](#)). En nuestro estudio, el área cerebral infartada tras la oclusión arterial permanente se limitó al córtex, dañando principalmente la región somatosensorial, y dentro de ella, a los campos representativos de las patas delanteras y de las vibrisas, con menor afectación de la corteza motora primaria. Empleando este mismo modelo y cepa de ratón, Wang y col., examinaron con tinción de Nissl la extensión del daño al séptimo día post-infarto, detectando que la región lesionada abarcaba esencialmente las mismas áreas corticales afectadas en nuestro estudio ([Wang et al 2013](#)). Un patrón similar de daño cortical fue demostrado por Kuraoka y col. utilizando nuestro mismo modelo (dMCAO) ([Kuraoka et al 2009b](#)). Sin embargo, a diferencia del estudio de Kuraoka y col., en nuestro caso el volumen de infarto inducido fue considerablemente menor a las 24 horas post-cirugía, un hecho probablemente relacionado con las distintas condiciones experimentales ensayadas y/o diferentes sub-cepas de ratón C57BL/6J empleadas en cada laboratorio ([Zurita et al 2011](#)), en nuestro caso, la subcepa empleada fue la C57BL/6J-OlaHsd.

La evaluación de los déficits sensorimotrices mediante el test del cilindro, mostró un incremento en el índice de lateralidad desde la primera semana post-infarto, que fue disminuyendo a lo largo del

estudio sin alcanzar valores basales (pre-infarto), poniendo de manifiesto la utilidad de este test para la detección de déficits permanentes, tal y como ha sido descrito previamente en otros modelos de daño cerebral por dMCAO y por foto-trombosis ([Brown et al 2009](#), [Clarkson et al 2013](#), [Jin et al 2010a](#), [Li et al 2004](#), [Roof et al 2001](#)). Por el contrario, los déficits detectados en el test de la rejilla basados en el porcentaje de fallos con la extremidad afectada, contralateral al hemisferio infartado, permanecieron elevados a lo largo de las semanas post-infarto, tal y como se ha descrito en ratas tras 4 semanas post-isquemia ([Stroemer et al 1995](#)) y más recientemente en ratones hasta 4-8 semanas tras la inducción de un infarto cortical por fototrombosis ([Alia et al 2016](#), [Clarkson et al 2013](#)). A pesar de que ambas pruebas de comportamiento sirvieron para detectar déficits permanentes más allá de 6-8 semanas post-ictus, los déficits fueron más acusados en el test de la rejilla. Las diferencias observadas entre ambos tests, podrían estar relacionadas con la diferente naturaleza de la tarea a realizar ([Hernandez & Schallert 1988](#)). El test del cilindro permite examinar la dependencia compensatoria del miembro no afectado en el movimiento exploratorio ([Jones 2017](#)), mientras que el test de la rejilla evalúa la coordinación de la marcha con ambas patas delanteras, que está relacionada con la percepción de los estímulos propioceptivos y visuales del animal ([Schaar et al 2010](#)), su coordinación motora, y los posibles mecanismos de compensación postural para la realización de la tarea ([Jones 2017](#)). Por tanto, las diferencias encontradas entre ambos tests podrían ser debidas principalmente a que los déficits examinados con la rejilla son puramente sensorimotores, a diferencia de los observados en la prueba del cilindro, que son de tipo compensatorio y revelan la compensación del miembro no parético a lo largo del estudio.

El efecto del infarto sobre la actividad de la corteza somatosensorial fue examinado mediante la exploración de la actividad evocada en respuesta a un estímulo sensorial en las extremidades delanteras. El estudio de los potenciales evocados sensorimotores y/o motores en la fase aguda o sub-aguda del ictus, se emplea como método predictivo de la recuperación funcional en pacientes ([Feys et al 2000](#), [Lee et al 2010b](#), [Macdonell et al 1989](#)). En modelos animales de daño cerebral, la actividad evocada en la corteza somatosensorial lesionada se ha examinado durante la fase aguda y crónica del ictus en ratas ([Ramos-Cabrer et al 2010](#), [Sakatani et al 1990](#), [Weaver et al 2002](#)), y de forma menos frecuente en ratones ([Brown et al 2009](#), [Sweetnam & Brown 2013](#)). El sistema somatosensorial comprende componentes del sistema nervioso central y periférico, que intervienen en la transmisión y el procesamiento de la información somatosensorial proveniente de mecanorreceptores, termorreceptores y nociceptores ([Kessner et al 2016](#)). Las neuronas sensoriales de primer orden, cuya terminación periférica son los receptores sensoriales, envían aferencias hacia el asta dorsal de la médula espinal y la región caudal del tronco del encéfalo, formando columnas dorsales. Las vías ascendentes de transmisión sensorial se dividen en dos; la vía anterolateral, compuesta por el tracto espino-talámico, espino-reticular y espino-mesencefálico, y la vía lemniscal o columna dorsal-lenmisco medial (**Figura 5.1.**). Ambas vías aferentes de información sensorial, entran a través del tálamo y desde ahí proyectan hacia la corteza

somatosensorial primaria a través de conexiones tálamo-corticales ([Sippy et al 2015](#)). El registro de la actividad provocada en la corteza somatosensorial tras la estimulación del nervio mediano permitió examinar la actividad de campo producida por la activación secuencial de varios circuitos corticales ([Jellema et al 2004](#)). Tras la estimulación, la entrada principal de información sensorial del tálamo es el borde de la capa cortical Vb / VI, la capa granular IV y la parte inferior de la capa III. En la capa IV, los axones de las células estrelladas y los axones-colaterales de las células piramidales, distribuyen las señales somatosensoriales dentro de las columnas corticales estableciendo sinapsis en las dendritas apicales de las células piramidales en las capas supragranulares II/III y la capa infragranular Vb ([Castro-Alamancos & Connors 1997](#)).

Figura 5.1. Dibujo esquemático de las vías ascendentes de información sensorimotora al cortex cerebral. A la izquierda del dibujo se muestra la vía ascendente lemniscal que lleva la información del tacto y la propiocepción, mientras que a la derecha el tracto espino-talámico asciende con información de dolor y temperatura, y su origen se encuentra en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales y en las astas dorsales de la médula espinal, respectivamente. En el tracto espino-talámico, el 90% de los axones de las neuronas aferentes cruzan la línea media (decan) a nivel de la médula espinal, y ascienden hacia el tálamo somatosensorial contralateral, y desde ahí, las neuronas talámicas proyectan sobre la corteza somatosensorial primaria. En el caso de la vía lemnisco medial, los axones de las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales entran en la médula espinal, y ascienden hacia el tronco del encéfalo (bulbo raquídeo) donde decusan formando el lemnisco medial, y ascienden hacia el núcleo ventral posterior al tálamo y de ahí hacia la corteza somatosensorial.

En estudios realizados en roedores con electrodos epidurales, se ha propuesto que la onda N1 refleja en su mayor parte la actividad de las células piramidales en la capa Vb, resultando en la despolarización de las dendritas apicales de las células piramidales de la capa supragranular II/III ([Jellema et al 2004](#)). En situación basal (pre-isquemia) la máxima activación registrada (onda N1) en la corteza somatosensorial (S₁FL) se produjo aproximadamente a los 20 ms tras la estimulación de la extremidad contralateral al hemisferio registrado. Este valor de latencia fue similar al obtenido con técnicas de imagen in vivo en ratones mediante el uso de sondas fluorescentes sensibles a voltaje (*"VSD Imaging"*) en combinación con microscopía multifotón ([Brown et al 2009](#), [Ferezou et al 2007](#), [Morales-Botello et al 2012](#), [Wang et al 2016b](#)). Con ambos tipos de técnicas (imagen y electrofisiología), tras la estimulación de la pata delantera, la máxima respuesta evocada en el cortex somatosensorial reflejó principalmente la actividad de las capas supragranulares II/III ([Jellema et al 2004](#), [Petersen et al 2003](#)).

En los últimos años, las técnicas de registro de actividad neuronal espontánea o provocada basadas en *"VSD Imaging"* han revolucionado el campo de la neurociencia experimental, especialmente para visualizar en tiempo real la dinámica espacio-temporal del procesamiento sensorial y motor ([Tsytarev et al 2014](#), [Wright & Jackson 2015](#)). Sin embargo, entre las limitaciones más importantes de esta técnica, se ha demostrado que ciertos tipos de sondas fluorescentes pueden ser neurotóxicas y afectar a la función celular de forma permanente ([Habib et al 2013](#), [Preuss & Stein 2013](#)), además las señales registradas con esta técnica son de tan baja amplitud que en muchos casos están sometidas a distintos artefactos como el originado por el latido cardíaco y la presión sanguínea pulsátil en arterias y capilares cerebrales ([Kozyrev et al 2014](#)). Otras desventajas estriban en el fenómeno de caída progresiva de la fluorescencia (*"bleaching"*) o que las señales registradas están restringidas a las capas supragranulares de la corteza cerebral ([Habib et al 2013](#), [Preuss & Stein 2013](#)). Por último, una de los mayores problemas se relaciona con la dificultad de realizar registros longitudinales en el mismo animal ([Ferezou et al 2009](#)), una limitación que puede ser superada con abordajes metodológicos como los presentados en esta memoria, realizando registros electrofisiológicos crónicos con electrodos quirúrgicamente implantados.

Continuando con nuestra discusión, en los animales infartados se produjo una supresión parcial de la respuesta provocada en la corteza somatosensorial del hemisferio afectado ante el estímulo contralateral, coincidiendo con resultados previos obtenidos en ratas ([Ramos-Cabrer et al 2010](#), [Weber et al 2008](#)), y soportados por estudios de resonancia magnética funcional ([Dijkhuizen et al 2001](#)), o por VSD ([Mohajerani et al 2011](#)). En nuestro estudio, únicamente 2 de los 15 animales analizados cursaron con un incremento progresivo de la respuesta evocada en el hemisferio afectado en paralelo a un menor número de fallos en el test de la rejilla, un hecho compatible con la posible recuperación parcial espontánea de este número reducido de animales a lo largo de las semanas post-infarto. Aunque la recuperación funcional espontánea en animales infartados se ha descrito con anterioridad en diferentes estudios, por ejemplo en modelos de ictus fototrombóticos

([Brown et al 2009](#)) y oclusivos ([Weber et al 2008](#)), a partir de la cuarta-octava semana respectivamente, en nuestro estudio sólo un 15 % de los animales mostraron fenómenos de recuperación espontánea. Este limitado porcentaje podría ser atribuido a la estabulación de los animales de forma individual, pues el aislamiento post-ictus se ha demostrado que disminuye la tasa de supervivencia de los animales y exacerba el tamaño del infarto ([Karelina et al 2009](#)), presentando mayores déficits sensorimotores en los animales ([Venna et al 2014](#)). En el estudio de Brown y col., llevado a cabo con técnicas de “VSD Imaging”, tras un infarto afectando al cortex somatosensorial correspondiente a la pata delantera (S₁FL), la recuperación espontánea se asoció con una actividad emergente (reorganización/plasticidad) peri-lesional en el campo motor primario (M1). Sin embargo, Weber y col., utilizando resonancia magnética funcional, asociaron la recuperación de los animales a la reaparición de actividad somatosensorial funcional en la representación original ([Weber et al 2008](#)). Estos estudios sirvieron de base para plantear la hipótesis de trabajo de esta Tesis, y examinar el mecanismo o mecanismos responsables de la recuperación funcional de los animales, que en nuestro estudio estuvo favorecido por el implante de células madre embebidas en geles de fibroína como se discutirá más adelante.

Otro hallazgo interesante en la caracterización de nuestro modelo experimental, fue el aumento progresivo de la respuesta contralateral (hiperexcitabilidad) en el hemisferio intacto de los ratones infartados. Este fenómeno ha sido descrito durante la fase crónica del ictus oclusivo y/o hemorrágico en pacientes ([Nakashima et al 1985](#)), y durante la fase aguda en roedores con infartos cerebrales de pequeño ([Mohajerani et al 2011](#)) y gran ([Dijkhuizen et al 2001](#)) tamaño. En el estudio de Dijkhuizen y col., se observó un aumento de la hiperexcitabilidad en el hemisferio contra-lesionado en la fase aguda del ictus (3 días post-infarto), seguido de una actividad emergente tardía en regiones peri-lesionadas del hemisferio afectado. El incremento de excitabilidad se produjo sin embargo durante la fase de mayores déficits sensorimotores efectuados con la extremidad afectada (contralateral al hemisferio infartado), siendo probablemente la actividad emergente en regiones peri-infartadas, responsable de la progresiva y tardía recuperación sensorimotora. Otros autores realizaron una observación similar, detectando un incremento de respuesta en el hemisferio contralesional circunscrito a las primeras horas post ictus ([Mohajerani et al 2011](#)). Se ha sugerido que la hiperexcitabilidad temprana observada en el hemisferio contra-lesional se debe a la falta de inhibición (desinhibición) del hemisferio lesionado sobre el hemisferio contra-lesional (intacto), en lugar de que dicha hiperexcitabilidad aguda pudiera producirse intra-hemisféricamente por mecanismos de reorganización cortical en el hemisferio contra-lesional, que implicarían cambios mucho más elaborados a lo largo de las semanas post-infarto ([Dijkhuizen et al 2001](#)). En relación a la desinhibición inter-hemisférica, estudios neuroanatómicos y funcionales mostrando la existencia de conectividad recíproca entre ambos núcleos talámicos ([Crabtree et al 1998](#), [Crabtree & Isaac 2002](#)), han servido de base para postular que las neuronas del núcleo reticular talámico de un hemisferio podrían inhibir a las neuronas del núcleo reticular talámico del hemisferio contralesional. Tras el ictus, la desinhibición

del tálamo contralesional podría conducir a una mayor respuesta de la circuitería tálamo-cortical tras el estímulo sensorial ([Mohajerani et al 2011](#)). Una segunda posibilidad para explicar los cambios agudos de excitabilidad en el hemisferio contra-lesional podría estar relacionada con una reducción local de la señalización GABAérgica y/o una potenciación glutamatérgica en el cortex contra-lesional ([Carmichael & Chesselet 2002](#), [Witte et al 2000](#)). Finalmente, también se ha propuesto que la desinhibición del hemisferio contralesional podría estar causada por fenómenos de despolarización cortical propagada ([Dreier & Reiffurth 2015](#)), eventos de despolarización masiva que se producen en las primeras horas post-infarto en pacientes y en animales ([Hinzman et al 2015](#), [Kao et al 2014](#), [Woitzik et al 2013](#)), y que podían propagarse independientemente de las fibras del cuerpo calloso del hemisferio infartado al contralesional ([Carmichael & Chesselet 2002](#), [Fifkova 1966](#)), reduciendo la influencia inhibitoria del núcleo reticular talámico sobre la circuitería talamo-cortical ([Bures et al 1963](#)). Sin embargo, hasta el momento es motivo de controversia el papel de la hiperexcitabilidad del hemisferio intacto en la recuperación funcional de pacientes y animales tras el daño cerebral ([Cramer 2008](#), [Schaechter & Perdue 2008](#), [Ward et al 2003](#)). En nuestro caso, la hiperexcitabilidad observada en el hemisferio intacto se restringió de forma significativa a las últimas semanas post-isquemia y estuvo asociada a fenómenos de recuperación funcional espontánea, puesto que los animales que presentaron menores déficits funcionales examinados mediante los test funcionales a lo largo del estudio, mostraron una fuerte hiperexcitabilidad en el hemisferio contralateral.

En nuestro estudio, en condiciones basales, la actividad ipsilateral de la corteza somatosensorial de ambos hemisferios se caracterizó por ser de menor amplitud que la activación contralateral. Además, la máxima activación ipsilateral ocurrió más tardíamente tras el estímulo (mayor latencia) que la correspondiente activación contralateral. En roedores y humanos se ha propuesto que los potenciales ipsilaterales generados en un hemisferio proceden mayoritariamente de la activación previa del hemisferio opuesto. Así, cuando se produce una respuesta evocada en un hemisferio, ésta se transmite a través de proyecciones inter-hemisféricas que discurren por el cuerpo calloso (CC) hacia regiones homólogas y no homólogas del hemisferio opuesto ([Allison et al 1989](#), [Mohajerani et al 2011](#), [Takatsuru et al 2009](#)), o bien a través del pequeño porcentaje de las aferencias de la vía lemniscal que no decusan a nivel del bulbo raquídeo ([Bureau et al 2006](#)). Takatsuru y col., observaron un incremento transitorio en la actividad ipsilateral del hemisferio no afectado en un modelo de infarto unilateral fototrombótico en el cortex somatosensorial del ratón ([Takatsuru et al 2009](#)). Sus resultados sugieren que ante un daño unilateral, las respuestas sensoriales de la extremidad afectada son procesadas en el cortex somatosensorial intacto del animal, relacionándose con un incremento en su actividad, posiblemente ocasionado por una disminución de la inhibición GABAérgica que favorece una plasticidad sináptica, que altera la conectividad cortical. De los estudios de Mohajerani y col. realizados con “VSD maging”, se ha sugerido que además de la vía trascallosa inter-hemisférica existe una vía alternativa para la transmisión de los potenciales ipsilaterales mediada por estructuras subcorticales que involucran

el tálamo ([Mohajerani et al 2011](#)). Sin embargo, si el origen de los potenciales ipsilaterales fuera predominantemente talámico, la activación cortical en ambos hemisferios sería prácticamente simultánea. Sin embargo, en nuestro estudio, la latencia encontrada entre las respuestas contralateral e ipsilateral, sugiere que la activación ipsilateral en respuesta a un estímulo sensorial (en este caso de la extremidad delantera) se produce por la activación previa del hemisferio contralateral y la transmisión vía cuerpo calloso, de esta respuesta al hemisferio opuesto. Mohajerani y col., en su modelo fototrombótico afectando principalmente al campo somatosensorial correspondiente a la pata delantera ([Mohajerani et al 2011](#)), observaron en un intervalo inferior a 2 horas post-ictus, cómo la respuesta ipsilateral del hemisferio sano no resultó sustancialmente afectada respecto a la condición pre-ictus, mientras que en el hemisferio dañado se produjo una abolición completa de respuesta ipsilateral en el campo somatosensorial correspondiente a la pata delantera (S₁FL) y una mayor activación en regiones adyacentes, correspondientes a la corteza primaria motora (M1) y al campo somatosensorial representativo de la extremidad posterior (H₁FL). En su trabajo, el bloqueo unilateral mediante tetrodoxina (TTX) de la actividad del campo representativo somatosensorial de la pata delantera (S₁FL), no reprodujo los efectos ipsilaterales observados en el modelo fototrombótico, dado que la inhibición farmacológica indujo una abolición prácticamente completa de los potenciales ipsilateres en ambos hemisferios, inyectado e intacto. Asimismo, la inyección de TTX en el núcleo talámico de un hemisferio para conducir a una desinhibición del hemisferio opuesto, tampoco produjo un aumento de actividad ipsilateral en el hemisferio inyectado o la abolición de respuesta en el hemisferio opuesto. En base a estos hallazgos, se ha sugerido que en las primeras horas post-ictus la transmisión ipsilateral es señalizada por rutas alternativas a las fibras del cuerpo calloso ([Armand & Kuypers 1980](#)), que tras el daño se activan para compensar la falta de entrada de información transcallosal. Sin embargo, tal y como sugieren Mohajerani y col., sus resultados no pueden trasladarse a lo que sucede en semanas posteriores al ictus, debido a la existencia de remodelación de la circuitería cortical ([Li & Carmichael 2006](#), [Stroemer et al 1993](#)).

En nuestro caso concreto, no se exploraron los cambios ipsilaterales en las primeras horas post-ictus, ni el modelo de infarto fue foto-trombotico, sino que empleamos un modelo oclusivo (dMCAO) de infarto unilateral, y registramos los cambios desde la primera semana en adelante (8 semanas de estudio), encontrando una disminución severa mantenida de la respuesta ipsilateral en ambos hemisferios. Un hecho corroborado en estudios recientes, en los que se observó una profunda abolición de la actividad ipsilateral en el hemisferio intacto, en animales sometidos a infartos unilaterales con afectación del cortex somatosensorial, mediante cirugía dMCAO ([Johnston et al 2013](#)) y fototrombosis ([Lim et al 2014](#)). Mediante imagen óptica de señales intrínsecas (IOS) que determina los cambios en las propiedades ópticas del tejido cerebral en respuesta a la estimulación sensorial, Johnston y col., no encontraron respuesta ipsilateral alguna en el hemisferio contralesional a lo largo de las semanas post-ictus ([Johnston et al 2013](#)). Paralelamente, mediante “VSD Imaging” en el estudio de Lim y col. se produjo una reducción

considerable de activación ipsilateral en el hemisferio intacto, en respuesta a la estimulación de la extremidad ipsilateral tras la primera y octava semana post-ictus ([Lim et al 2014](#)). Usando técnicas de foto-estimulación, tras 1 y 8 semanas post-infarto, los mismos autores observaron una marcada reducción de la respuesta ipsilateral en ambos hemisferios, contralesional e infartado ([Lim et al 2014](#)). En nuestro estudio, en las sucesivas semanas post-ictus, la reducción de respuesta ipsilateral en el hemisferio intacto, podría estar relacionada con la supresión de respuesta contralateral en el hemisferio infartado y por tanto, tal y como se ha ido argumentando, con la falta de transmisión de actividad hacia el hemisferio intacto vía cuerpo calloso. Sin embargo la explicación del porqué se produjo una reducción de respuesta ipsilateral en el hemisferio infartado es menos intuitiva, pudiendo estar relacionada con cambios degenerativos en el cuerpo calloso que han sido previamente descritos en infartos unilaterales ([Adkins et al 2004](#)). Además, el progresivo incremento de actividad ipsilateral en el hemisferio infartado a partir de la tercera-cuarta semana post-ictus, correlacionó con los cambios de hiperexcitabilidad observados en el hemisferio contra-lesional a partir de ese punto temporal. Resumiendo, los hallazgos encontrados en nuestro estudio avalan el hecho de que la activación ipsilateral se debe de producir gracias a la existencia de conectividad inter-hemisférica a través de fibras del cuerpo calloso.

La utilización de ratones de la cepa C57BL/6J ha sido empleada en una gran variedad de estudios como modelo de daño cerebral ([Ferezou et al 2007](#), [Lim et al 2012](#), [Mohajerani et al 2011](#), [Mohajerani et al 2013](#), [Mora-Lee et al 2012](#)). En neurociencia, este fondo genético se ha utilizado de forma eficaz en estudios de optogenética ([George & Steinberg 2015](#), [Hira et al 2015](#), [Lim et al 2014](#), [Lim et al 2012](#)). Dado que el objetivo principal de esta Tesis Doctoral, fue explorar la acción terapéutica de las MSC/P integradas en los hidrogeles de fibroína, la reducida afectación de territorio cortical, y la variabilidad observada en los déficits funcionales examinados en los ratones de la cepa C57BL/6J, plantearon inconvenientes importantes para la continuidad del estudio terapéutico utilizando este fondo genético. Por otro lado, en el modelo dMCAO se ha descrito que diferencias en la circulación sanguínea cerebral o la resistencia al daño hipóxico son mayoritariamente responsables de la variabilidad en el tamaño de infarto y los déficits funcionales entre distintas cepas de ratón ([Balkaya et al 2013](#), [Smajlovic 2015](#), [Zhang et al 2010](#)). Por ejemplo, en el caso concreto de los ratones CD-1 y C57BL/6J se ha observado que la supervivencia frente a condiciones de hipoxia, es mucho más reducida en la primera de las dos cepas ([Zwemer et al 2007](#)), debido a que los ratones C57BL/6J no reducen su demanda metabólica en respuesta a la hipoxia, sino que poseen una mayor eficiencia energética en el uso de los nutrientes. Por otro lado, la respuesta celular frente a un daño isquémico cerebral en ambas cepas, ha revelado un incremento en la producción del factor de respuesta hipóxica 1 (HIF 1) en los ratones CD-1 ([Li et al 2009a](#)), que se encuentra directamente relacionado con rutas de señalización que incrementan la producción de proteínas apoptóticas, como la BNIP3 ([Greijer & van der Wall 2004](#)), originando infartos de mayor afectación. En base a estos antecedentes, en esta memoria realizamos un estudio comparativo entre las cepas de ratón C57BL/6J y CD-1. En cuanto al territorio cortical

afectado, los ratones CD-1 presentaron un infarto más reproducible y con volúmenes de afectación significativamente superiores que los C57BL/6J. La elección de los ratones CD-1 como modelo terapéutico de ictus nos planteó un importante dilema. Primero porque es conocido en modelos animales y en pacientes, que aquellos infartos cubriendo grandes extensiones de territorio cortical se asocian con una pobre recuperación funcional ([Balkaya et al 2013](#), [Park et al 2007](#)), lo que podría haberse manifestado en una ineficiente respuesta terapéutica. Segundo, porque una gran mayoría de estudios previos en los que se ha estudiado la recuperación funcional espontánea o inducida por un posible tratamiento se han realizado en ratones de fondo genético C57BL/6J ([Alia et al 2016](#), [Brown et al 2009](#), [Brown et al 2007](#), [Clarkson et al 2010](#), [Clarkson et al 2013](#), [Overman et al 2012](#), [Taguchi et al 2004](#), [Wang et al 2016b](#)) y no disponíamos de evidencias previas que justificaran el uso de esta nueva cepa. Sin embargo, la mayor consistencia y menor variabilidad de los déficits funcionales así como la fuerte correlación, exclusiva de la cepa CD-1, entre el grado de alteración sensorimotor y el volumen de infarto, resultaron de gran ayuda para la elección final de esta cepa (CD-1).

Para el estudio de la actividad cortical evocada, en ambas cepas se empleó un nuevo paradigma experimental basado en el registro simultáneo de potenciales evocados en las representaciones correspondientes al área somatosensorial (S_1FL) y motora (m_1CFL) de la pata delantera. Los electrodos se colocaron en posiciones anatómicas ([Paxinos & Franklin 2004](#)) y funcionales ([Alia et al 2016](#), [Ferezou et al 2007](#), [Hira et al 2013](#), [Hira et al 2015](#), [Lim et al 2012](#), [Tennant et al 2011](#)) conocidas en el ratón. El implante de electrodos en el área S_1FL se basó en estudios de “VSD Imaging” donde la estimulación táctil ([Ferezou et al 2007](#)) o eléctrica ([Lim et al 2012](#)) de la pata delantera provocó una fuerte actividad en dichas coordenadas somatotípicas. Por el contrario, el implante de electrodos en la representación m_1CFL se basó en estudios de “mapping” motor e inducción de actividad motora periférica mediante estimulación eléctrica intra-cortical ([Alia et al 2016](#), [Tennant et al 2011](#)) y fotoestimulación ([Hira et al 2013](#), [Hira et al 2015](#)). El análisis comparativo de las respuestas evocadas entre ambas cepas de ratón, puso de manifiesto diferencias en el patrón de conectividad funcional intra e inter-hemisférica. Como cabría esperar de nuestros resultados previos, la máxima amplitud de respuesta evocada contralateral en S_1FL se produjo en ambas cepas de ratón en torno a los 20 ms tras la estimulación. A consecuencia de la estimulación sensorial, también se detectó un potencial de menor amplitud y mayor latencia en m_1CFL . El retraso en la latencia de la respuesta registrada en m_1CFL (~ 4 ms) fue similar en ambas cepas de ratón. Dado que la distancia entre electrodos fue de ~1400 μm , y la velocidad de conducción axonal en neuronas piramidales de corteza es en torno a ~450 $\mu m/ms$ ([Meeks & Mennerick 2007](#)), un valor que se encuentra en el rango de la velocidad de conducción cortico-cortical observada en conejos ([Swadlow 1990](#)), esta latencia registrada entre ambas regiones corticales, es incompatible con fenómenos de conducción por volumen, y sugiere la existencia de activación en m_1CFL circuitalmente dependiente de la actividad previa evocada en S_1FL . La existencia de conectividad cortico-cortical entre S_1FL y m_1CFL pudo ser asimismo inferida del

análisis de correlación obtenido entre las máximas amplitudes de respuestas encontradas en ambos campos corticales, y que ha sido descrita en estudios anatómicos y funcionales en la rata y en el ratón ([Ferezou et al 2007](#), [Lim et al 2014](#), [Lim et al 2012](#), [Morales-Botello et al 2012](#), [Oh et al 2014](#), [Zakiewicz et al 2014](#)). Los estudios neuroanatómicos de Oh y col., mostraron, empleando trazadores fluorescentes, la existencia de proyecciones axonales intracorticales entre la corteza somatosensorial primaria (S1) y secundaria (S2) y el cortex motor (M1) del mismo hemisferio, además de proyecciones inter-hemisféricas más débiles con las cortezas somatosensorial y motora del hemisferio opuesto. La existencia de conectividad funcional entre los campos representativos motor y somatosensorial se ha descrito en otro modelo experimental alternativo como es el de las vibrisas de los roedores ([Ferezou et al 2007](#)). Mediante técnicas de “VSD Imaging” y registros de actividad de campo (LFP), la estimulación de una única vibrisa de los bigotes del ratón provocó un LFP en el área somatosensorial contralateral y 8 ms después se produjo una fuerte activación de la corteza motora primaria del mismo hemisferio. Asimismo, ~14 ms después de la estimulación, en el hemisferio contralateral (ipsilateral a la vibrisa estimulada) se activaron de forma simultánea las regiones somatosensorial y motora del hemisferio opuesto, como se discutirá más adelante. En su estudio, la inyección de antagonistas de receptores de glutamato en el cortex somatosensorial permitió demostrar la dependencia circuital entre ambas regiones corticales (somatosensorial y motora) del mismo hemisferio, puesto que en esas condiciones, tras la estimulación sensorial del bigote, no se detectó respuesta evocada alguna en los campos somatosensorial y motor. Farkas y col., demostraron en ratas anestesiadas que la estimulación eléctrica del nervio trigémino condujo a la activación de una subpoblación de neuronas en el cortex motor ([Farkas et al 1999](#)). En su estudio, quisieron determinar la vía aferente de información hacia la corteza motora, a través del nucleo ventral y/o posterior del tálamo, o mediante conexiones cortico-corticales a partir del área somatosensorial de las vibrisas. La aplicación de lidocaína, bloqueante de la actividad eléctrica neuronal o la ablación de la porción del cortex somatosensorial del campo representativo de las vibrisas, suprimió las respuestas evocadas ante la estimulación del trigémino en el cortex motor M1 contralateral. De forma ipsilateral, tampoco se registró una respuesta. Sin embargo, la estimulación en la región de la corteza motora M1, si condujo a una respuesta ipsilateral en el área homotópica del hemisferio contrario, sugiriendo que ambas regiones se encuentran conectadas transcallosalmente.

Aun cuando en nuestro estudio, la estimulación sensorial de la pata delantera originó en el hemisferio contralateral la generación de un potencial de campo en la región m_1CFL , siendo esta respuesta consecuencia de la activación previa del área S_1FL , en el estudio de Ferezou y col., y a diferencia de los resultados obtenidos con la estimulación de las vibrisas, la estimulación de la pata delantera evocó un único foco de activación en el hemisferio contralateral, probablemente debido al solapamiento topográfico entre ambas representaciones corticales (somatosensorial y motora) para la pata delantera ([Alia et al 2016](#), [Ferezou et al 2007](#), [Hira et al 2013](#), [Hira et al 2015](#), [Lim et al 2012](#), [Tennant et al 2011](#)), que impidió la discriminación funcional entre ambos

campos corticales bajo sus condiciones experimentales. Sin embargo, de forma similar a nuestros resultados, la estimulación de la extremidad delantera sí que provocó la aparición de dos focos de activación en el hemisferio ipsilateral.

Los estudios del profesor Timothy Murphy (Universidad de Columbia, Canadá) han sido de gran importancia para comprender el conectoma sensorimotor de los roedores. Mediante “VSD Imaging” y estimulación sensorial en combinación con técnicas de fotoestimulación cortical en ratones expresando la proteína canalrodopsina-2 (ChR2) el Profesor Murphy demostró que la estimulación del campo S₁FL producía la subsiguiente activación del campo m₁CFL, además de una respuesta de menor amplitud en los campos corticales homólogos del hemisferio opuesto ([Lim et al 2014](#), [Lim et al 2012](#)). En nuestro trabajo demostramos que la estimulación de una extremidad provoca la activación de las representaciones S₁FL y m₁CFL del hemisferio del mismo lado (ipsilateral a la pata estimulada), un hallazgo consistente con estudios previos ([Lim et al 2014](#), [Lim et al 2012](#)). Sin embargo, la activación ipsilateral en ambos campos corticales fue inferior en los ratones de la cepa CD-1, que en los C57BL/6J. Morales-Botello y col., realizaron estudios de conectividad funcional en la rata, mediante la estimulación eléctrica y el registro de la actividad evocada en ambos hemisferios mediante “VSD Imaging” ([Morales-Botello et al 2012](#)). Sus resultados comparten similitudes y diferencias con nuestras observaciones. En su trabajo, la activación ipsilateral originó también dos focos de activación localizados en el cortex motor y somatosensorial, aunque espacialmente no coincidieron con las coordenadas somatotípicas de activación contralateral ([Morales-Botello et al 2012](#)). Además, su activación ipsilateral en el cortex motor (región medial) fue de mayor amplitud y latencia que la activación detectada en regiones posteriores correspondientes a la corteza somatosensorial. En virtud de nuestros hallazgos y el valor similar de latencia encontrada entre la activación contralateral secuencial de S₁FL y m₁CFL en ambas cepas de ratón, los ratones CD-1 podrían compartir un mapa sensorimotor muy similar al de los ratones C57BL/6J, sin embargo las sutiles diferencias encontradas en conectividad funcional, podrían tener cierto correlato anatómico diferencial entre cepas, un planteamiento actualmente en estudio.

Una semana después de la inducción del infarto cortical, se realizó en ambas cepas de ratón el registro de la actividad provocada en ambos hemisferios ante un estímulo contralateral e ipsilateral. Este punto temporal (una semana) fue seleccionado en base a la estabilidad del volumen de infarto cortical y a la prácticamente ausencia de fenómenos de recuperación funcional espontánea ([Brown et al 2009](#), [Weber et al 2008](#)). En cuanto a la estimulación contralateral, la preservación de la relación de actividad (ratio) S₁FL/m₁CFL, y la correlación significativa entre ambas respuestas corticales en el hemisferio no infartado fue indicativo de que la conectividad entre ambos campos, somatosensorial y motor, no se vio afectada en este hemisferio.

Por el contrario, tal y como se esperaría de la primera fase del estudio con los ratones C57BL/6J, en ambas cepas de ratón se produjo una reducción considerable de la activación contralateral en

el campo somatosensorial del hemisferio infartado. También en este hemisferio disminuyó la actividad en el campo motor, denotando de nuevo, la dependencia circuital entre ambos campos corticales. Estos hallazgos son coherentes con los resultados de Lim y col., en los que la fotoestimulación de la representación S₁FL en el hemisferio infartado no produjo activación del campo m₁CFL una semana post-infarto, a diferencia de la fotoestimulación en el hemisferio intacto del campo S₁FL, que condujo a una respuesta normal en la representación motora de su mismo hemisferio ([Lim et al 2014](#)), al igual que en nuestros resultados obtenidos para ambas cepas de ratón. En cuanto a la activación ipsilateral, Lim y col., registraron una profunda abolición en ambos hemisferios una semana tras la inducción del infarto fototrombótico ([Lim et al 2014](#)). En nuestro caso, en los ratones CD-1 dicha activación ipsilateral resultó parcialmente abolida en ambos hemisferios, al contrario de lo sucedido en la cepa C57BL/6J, donde se produjo una mayor abolición de la respuesta ipsilateral bi-hemisférica, lo que podría reflejar diferencias en la conectividad transcallosal en situación basal y post-infarto entre ambas cepas de ratón.

En resumen, en condiciones fisiológicas, en ambas cepas de ratón se demostró la activación secuencial de los campos somatosensorial y motor correspondientes a la extremidad delantera (**Figura 5.2.**). La activación ipsilateral produjo dos focos simultáneos de actividad, un hecho compatible con la existencia de conectividad anatómico-funcional entre el campo somatosensorial de un hemisferio y las representaciones somatosensorial y motora del hemisferio opuesto (**Figura 5.2.**), y que avala previas evidencias anatómicas y funcionales ([Ferezou et al 2007](#), [Lim et al 2012](#), [Morales-Botello et al 2012](#), [Oh et al 2014](#), [Zakiewicz et al 2014](#)), enfatizando lo indispensable de la coordinación interhemisférica para lograr una mejor coordinación sensorial y motora entre ambos lados del cuerpo.

Asimismo, a una semana post-infarto en ambas cepas de ratón, se produjo una reducción de la activación ipsilateral en ambos hemisferios que podría explicarse por cambios de conectividad interhemisférica (degeneración callosal) y ausencia de potenciales evocados en el hemisferio infartado (**Figura 5.2.**). Debido probablemente a su relativa simplicidad estructural, en una gran mayoría de estudios previos ha resultado siempre conveniente la exploración del sistema somatosensorial de las vibrisas de roedores. Sin embargo, el procesamiento somatosensorial de las extremidades es menos conocido y nuestro estudio además de examinar este aspecto, ha proporcionado claves generales sobre el procesamiento sensorial y motor de ambos hemisferios en condiciones fisiológicas y tras la inducción de un infarto restringido al córtex cerebral.

Figura 5.2. Modelo de conectividad funcional intra e inter-hemisférica, en condiciones fisiológicas y 1 semana después de la inducción de un infarto unilateral. Esquema ilustrativo representando la conectividad funcional entre las áreas somatotípicas correspondientes a la corteza somatosensorial (S₁FL; en azul) y motora (m₁CFL; en verde) de la pata delantera en una situación previa al infarto (parte superior del esquema; enmarcado en gris), y una semana después de la inducción de un infarto unilateral oclusivo (parte inferior del esquema, enmarcado en rojo pálido). Se representa como tras la estimulación eléctrica de la pata delantera del animal, y a través de la vía aferente de información sensorial lemnisco-medial, los axones de las neuronas de primer orden (en negro) ascienden desde la médula espinal hacia el bulbo raquídeo, donde las neuronas aferentes de segundo orden (en marrón), decusan y ascienden hacia el núcleo ventral-posterior del tálamo. Desde ahí, las neuronas sensoriales de tercer orden (en morado), llevan la información hasta la corteza somatosensorial representativa de la pata delantera (porción cortical en azul). Esta vía de información es mantenida tanto en condiciones pre (dibujo superior) como post-ictus (dibujo inferior). Una vez la información sensorial llega a la corteza S₁FL, en la situación basal pre-isquemia, el cortex somatosensorial transmite intra e inter-hemisféricamente dicha información hacia el cortex motor ipsilateral (porción cortical en verde; m₁CFL), y hacia regiones homólogas (S₁FL y m₁CFL) del hemisferio contrario (panel superior en gris). Sin embargo, tras la inducción de un infarto unilateral (panel inferior en rojo pálido), cuando la información sensorial llega al cortex infartado, el daño producido no permite la transmisión inter o intra-hemisférica (a la derecha en el panel inferior), sin embargo, cuando la información sensorial llega al hemisferio intacto (izquierda del panel inferior), la información sensorial es transmitida tanto al cortex motor ipsilateral, como a las regiones homólogas del hemisferio contrario, en este último caso, con una reducción moderada de dicha transmisión, respecto a la situación basal.

5.3. Remodelación cerebral y recuperación funcional post-ictus asistida con el tratamiento de MSC integradas en fibroína

Para una gran mayoría de los pacientes, no hay terapias efectivas capaces de reparar el daño cerebral. En modelos de daño cerebral afectando al cortex sensorimotor, no están completamente dilucidados los mecanismos moleculares y celulares responsables de la recuperación funcional espontánea o inducida tras un posible tratamiento ([Alia et al 2017](#), [Carmichael 2006](#)). Como previamente se ha comentado, conceptualmente, la mejora funcional podría estar relacionada con; 1) la reorganización cortical de los hemisferios afectado ([Brown et al 2009](#)) y sano ([Dijkhuizen et al 2001](#)); 2) el restablecimiento/restitución de la circuitería en aquellas áreas funcionalmente dañadas ([Ramos-Cabrer et al 2010](#), [Taguchi et al 2004](#), [Wang et al 2016b](#)); 3) estrategias posturales compensatorias especialmente relacionadas con infartos de gran tamaño y/o con afectación del cortex motor ([Farr & Whishaw 2002](#), [Moon et al 2009](#)). Hace casi 70 años, Donald Hebb postulo que: "Cuando un axón de una célula A está lo suficientemente cerca como para excitar a una célula B y repetidamente la célula A toma partido en la activación de la célula B, se deben de producir procesos de crecimiento o cambios metabólicos en una o en ambas células de manera que tanto la eficiencia de la célula A, como la capacidad de excitación de la célula B se vean aumentadas (Hebb, D.O. *The organization of behavior*. 1949 ([Morris 1999](#)). Esta afirmación forma parte de la teoría "Hebbiana" que propone una explicación a la adaptación de las neuronas del cerebro durante el aprendizaje, describiendo un mecanismo básico de plasticidad sináptica, donde el incremento de la eficacia sináptica depende de la estimulación continua y persistente de la neurona pre-sináptica sobre la neurona post-sináptica.

Esta teoría sentó las bases del remodelado de la conectividad neuronal en base al aprendizaje. Un hecho bien establecido en diferentes especies incluido el hombre es que el cerebro se remodela (reorganiza) en condiciones fisiológicas y patológicas ([Brown et al 2009](#), [Elbert et al 1997](#), [Jaillard et al 2005](#), [Jenkins et al 1990](#), [Merzenich et al 1984](#), [Nudo & Milliken 1996](#), [Nudo et al 1996a](#), [Schaechter et al 2006b](#), [Traversa et al 1997](#)). Durante el desarrollo del cerebro, la nueva circuitería emergente se organiza para presentar las capacidades sensoriales, motoras y cognitivas, éstas últimas, variablemente distribuidas ([Alia et al 2017](#)). En la corteza cerebral, los mapas sensorimotors inicialmente establecidos no son estáticos, sino que pueden variar dinámicamente en base a la entrada de información sensorial, la experiencia y el aprendizaje ([Elbert et al 1997](#), [Jenkins et al 1990](#), [Kleim & Jones 2008](#), [Murphy & Corbett 2009](#), [Nudo et al 1996a](#)). Las modificaciones/remodelaciones de los mapas/representaciones sensorimotors ocurren también en respuesta a la pérdida de un miembro (amputación de dedos y/o extremidades) ([Calford & Tweedale 1988](#), [Elbert et al 1997](#), [Merzenich et al 1984](#), [Simoes et al 2012](#)) o por el desuso de los miembros paréticos tras un posible daño cerebral ([Hoare et al 2007](#), [Liepert et al 2001](#), [Taub et al 1993](#)). Además, se encuentra generalmente aceptado que los principios generales que orquestan la nueva circuitería durante el desarrollo del cerebro son los

mismos que gobiernan la formación de circuitos compensatorios para promover la recuperación funcional tras el daño cerebral. En este sentido, varias son las evidencias encontradas sobre modificaciones en las representaciones sensoriales y motoras en el hemisferio afectado y no afectado tras un daño cerebral ([Brown et al 2009](#), [Harrison et al 2013](#), [Nudo & Milliken 1996](#), [Tennant et al 2015](#)). En el caso del hemisferio afectado, parece existir un programa complejo, evolutivamente conservado, capaz de reorganizar las áreas ("*brain remapping*") no afectadas adyacentes a la región dañada y tomar parte en el control ("*Vicarious Processes*") de las funciones específicas pérdidas e inicialmente dependientes del área lesionada.

Como más tarde se discutirá, en nuestro estudio, la recuperación funcional exclusiva de los animales tratados con MSCs integradas en geles de fibroína se relacionó con un nuevo mapa cortical y una actividad sensorial emergente en la corteza motora. Tras un daño cerebral como el causado por un ictus, se presenta un escenario complejo, dado que la pérdida repentina de un número significativo de neuronas y sinapsis dificulta en gran medida la reorganización del resto del cerebro no dañado ([Teasell et al 2005](#)). A nivel molecular y celular son varios los mecanismos responsables de la plasticidad cerebral encargada de compensar o recuperar la función de las regiones sensoriales y motoras ([Nudo 2007](#)). Los mecanismos moleculares, implican cambios en la expresión génica y en el equilibrio de los receptores excitadores/inhibidores ([Alia et al 2016](#)). A nivel celular, se observan cambios en la distribución, el número y la disposición de las sinapsis, así como en el número y estructura de las espinas dendríticas y/o en las ramificaciones axonales ([Brown et al 2007](#)). Las modificaciones moleculares y estructurales repercuten en la distribución de los mapas corticales. Este tipo de fenómenos de remodelación post-ictus se han descrito en pacientes y en animales de forma espontánea, tras la rehabilitación física o usando técnicas de estimulación cerebral ([Cicinelli et al 1997](#), [Jaillard et al 2005](#), [Liepert et al 2004](#), [Rossini et al 2001](#), [Schaechter et al 2006a](#), [Schaechter & Perdue 2008](#), [Traversa et al 1997](#)). La neurorehabilitación física por ejemplo, ha resultado ser un paradigma eficiente para promover la reorganización cortical en el tejido adyacente no dañado, aumentando la recuperación funcional tras el ictus o los traumatismos cerebrales ([Combs et al 2016](#), [Hoare et al 2007](#), [Jones et al 2009](#), [Nudo & Milliken 1996](#)). La pérdida de territorio cortical es sustancial cuando un miembro en particular cae en desuso, empeorando los déficits sensorimotores en infartos unilaterales, algo que puede ser prevenido empleando técnicas de restricción del movimiento no parético, o la realización de tareas que involucren un alto grado de sincronización de movimientos con la extremidad afectada, contralateral al hemisferio dañado ([Hoare et al 2007](#), [Liepert et al 2001](#), [Taub et al 1993](#)). En algunos estudios se ha observado una correlación entre la recuperación funcional de los pacientes y la reorganización cortical inducida por la rehabilitación ([Cicinelli et al 1997](#)). Esta reorganización puede producirse de forma bilateral e incluir no sólo regiones peri-lesionadas que bordean la región del infarto en el hemisferio dañado, sino también afectar regiones homólogas y no homólogas del hemisferio sano ([Cramer 2003](#)). Sin embargo, existe actualmente una gran controversia en cuanto a si la reorganización cortical observada tras el daño cerebral carece de

relación con la recuperación funcional ([Liepert et al 1998](#), [Xerri et al 1998](#)), si supone una modificación maladaptativa que contribuye a empeorar los déficits sensorimotoreos ([Dancause 2006b](#)) o si más bien, contribuye a la mejoría funcional post-ictus ([Castro-Alamancos & Borrel 1995](#), [Cicinelli et al 1997](#)).

Varios fueron los trabajos pioneros realizados en monos demostrando que la neurorrehabilitación producía cambios plásticos en el cerebro que conducían a una recuperación funcional sensorimotora de los animales tras el daño cerebral ([Nudo & Milliken 1996](#), [Xerri et al 1998](#)). En estudios realizados en roedores, los fenómenos de plasticidad espontánea se observan principalmente en aquellos infartos sensorimotoreos de menor tamaño ([Brown et al 2009](#), [Harrison et al 2013](#), [Nishibe et al 2010](#), [Winship & Murphy 2008](#)), aun cuando en una inmensa mayoría de estos trabajos no se ha observado una relación directa entre los cambios corticales específicos y la mejoría de los animales. En estos modelos, los cambios corticales se restringen al área frontera peri-lesionada ([Alia et al 2016](#), [Brown et al 2009](#), [Dijkhuizen et al 2001](#), [Winship & Murphy 2008](#)). Una reducción de la señalización GABAérgica post-ictus parece contribuir a la reorganización de los mapas corticales ([Jacobs & Donoghue 1991](#), [Jones 1993](#)), dado que en condiciones normales, este tipo de señalización contribuye a definir las áreas topográficas previniendo la invasión funcional entre distintas representaciones sensorimotoras ([Calford & Tweedale 1988](#), [Jacobs & Donoghue 1991](#)). Por tanto la inhibición de la señalización GABAérgica debería favorecer la reestructuración cerebral en regiones peri-infartadas y promover la recuperación funcional, un abordaje experimental demostrado previamente en ratones infartados tratados crónicamente con antagonistas de receptores GABA_A ([Clarkson et al 2010](#)).

En nuestro estudio, tras el infarto cerebral no detectamos ningún signo de recuperación funcional (examinada con el test de la rejilla) en los animales estriatalmente inyectados con PBS o con MSC solas. Ambos grupos de animales mostraron una abolición considerable y permanente (10 semanas de estudio) de actividad evocada en los campos somatosensorial y motor respectivamente. Esta falta de respuesta evocada en ambos mapas corticales es principalmente compatible con la existencia de un daño extenso en el territorio cortical, que podría justificar la pobre recuperación funcional característica de aquellos infartos de mayor tamaño ([Moon et al 2009](#), [Whishaw 2000](#)). Por el contrario, una progresiva recuperación funcional se observó en los ratones infartados implantados con MSC embebidas en fibroína. Este tercer grupo de animales presentó una actividad evocada residual en la representación S₁FL durante las primeras semanas post-tratamiento, que se correlacionó con la actividad detectada en m₁CFL en respuesta al estímulo sensorial, y que refleja la conectividad entre ambos campos corticales y la retroalimentación sensorimotora previamente discutida. Sin embargo a partir de la sexta semana, cuando la recuperación sensorimotora fue significativamente mayor, se produjo una desconexión entre ambas representaciones corticales y una nueva actividad sensorial emergente y tardía en el campo motor m₁CFL que contribuyó a la recuperación sensorimotora de los ratones (**Figura 5.3.**), tal y como ha sido descrito durante la fase de recuperación espontánea en ratones con infartos de

pequeño tamaño afectando al cortex somatosensorial ([Brown et al 2009](#)). En nuestro estudio no se incluyó un grupo de animales implantados únicamente con el biomaterial. En este contexto, se ha descrito, que la fibras de fibroína promueven y dirigen el crecimiento axonal in vitro ([Wittmer et al 2011](#)), e in vivo ([Radtke et al 2011](#)), y muestran una excelente compatibilidad con células de schwann ([Rao et al 2017](#), [Schuh et al 2016](#)), astrocitos ([Qu et al 2013](#)) y neuronas ([Roloff et al 2014](#)). Sin embargo, tal y como indican resultados recientes de nuestro laboratorio, los animales infartados implantados exclusivamente con soluciones de fibroína no mostraron indicios de recuperación sensorimotora, siendo la extensión de territorio cortical afectado muy similar al de ratones implantados con PBS o MSC sólo (resultados recientes no mostrados), descartando por tanto que este biomaterial por si sólo pueda ser el responsable del efecto terapéutico observado en los animales implantados con MSC/P integradas en fibroína.

Dos fenómenos secuenciales podrían explicar el efecto positivo de la terapia en este grupo de animales (SF-MSC). Primeramente, la preservación parcial de respuesta evocada en S₁FL, ligada a una menor extensión de daño cortical adscrita a las conocidas propiedades neuro-protectoras, inmunosupresoras y anti-inflamatorias de las MSC ([Steinbeck & Studer 2015](#), [Trounson & McDonald 2015](#)), propiedades que fueron visiblemente potenciadas cuando esta población celular fue implantada junto al biomaterial. Segundo, y probablemente más importante, el menor daño cortical presente en este grupo de ratones (SF-MSC) podría constituir un pre-requisito para favorecer fenómenos tardíos de remodelación cortical promoviendo la recuperación funcional de los animales (**Figura 5.3.**). Tal y como ha sido mencionado, la reorganización cerebral en áreas peri-lesionas es mucho más activa en aquellos infartos afectando a pequeñas extensiones de territorio cortical ([Dancause 2006b](#), [Murphy & Corbett 2009](#)), un hallazgo que justifica la falta de actividad emergente sensorial en m₁CFL en los animales inyectados con PBS o MSC solas, los cuales mostraron infartos de mucha mayor extensión.

Figura 5.3. Recuperación funcional y remodelación cerebral post-ictus asistida por el tratamiento con MSC/P encapsuladas en geles de fibroína. Esquema ilustrativo representando las dos fases de acción terapéutica de las MSC/P encapsuladas en fibroína: neuroprotección y reorganización cortical. A la izquierda del esquema (enmarcado en azul), se muestran las áreas somatotípicas de la corteza somatosensorial (S₁FL; en azul) y motora (m₁CFL; en verde) correspondientes a la pata delantera en una situación previa al infarto, indicando con flechas amarillas la correlación entre las respuestas evocadas en ambas regiones (círculos concéntricos azules: S₁FL, y verdes: m₁CFL), que son circuitalmente dependientes en una situación basal. Tras la inducción del infarto y la aplicación del tratamiento terapéutico (a la derecha del esquema, enmarcado en rojo), en el grupo de animales implantados con la SF-MSC, la neuroprotección adscrita a la acción terapéutica de las MSC/P, disminuyó la cantidad de territorio cortical afectado tras el infarto (porciones en blanco), preservando parcialmente la actividad evocada en ambas representaciones corticales (actividad reflejada en el esquema por un menor número de líneas concéntricas) así como la conectividad funcional entre campos. Semanas después del tratamiento y coincidiendo con la fase de mayor recuperación funcional, se produjo la desconexión circuital entre ambas representaciones corticales (línea roja), un hecho que se relacionó con un descenso de actividad evocada en el cortex somatosensorial y una actividad sensorial emergente en la corteza motora (reflejado en las líneas concéntricas de actividad por la transición de color verde a azul). Por el contrario en los animales trasplantados con las MSC/P o inyectados con la solución salina (PBS), la pérdida de territorio cortical tras el infarto fue mayor (representando el área somatosensorial y motora en blanco), traduciéndose en una pérdida de actividad somatosensorial completa en el área representativa de la pata delantera.

En relación al carácter neuroprotector de las MSC, se sabe, que tras el daño isquémico se produce una pérdida significativa de microvasculatura en el hemisferio lesionado ([Krupinski et al 1994](#)), y estudios realizados en roedores, han identificado un incremento de la angiogénesis cerebral en zonas de penumbra isquémica tras el trasplante intracerebral de MSC/P ([Bao et al 2011](#)). En el estudio de Bao y col., se encontró una disminución del volumen de tejido cortical afectado por el incremento de la vasculatura cerebral a partir de la acción paracrina de las MSC/P implantadas. En su modelo de infarto cerebral (MCAO), Bao y col., encontraron una reducción del tejido cortical afectado, de aproximadamente el 10% con respecto al grupo de ratas infartadas no tratadas. En nuestro caso, respecto a los animales inyectados con PBS, encontramos una

disminución del territorio cortical infartado de aproximadamente 40-50% en el grupo de animales trasplantados con las MSC/P integradas en los hidrogeles, y del 5-10% para los animales trasplantados con las MSC/P solas. Las diferencias encontradas, podrían deberse a la mayor supervivencia de las MSC/P cuando éstas se encapsularon en los geles de fibroína. Los resultados estereológicos del objetivo 2 parecen confirmar esta idea, dado que 72 horas después del trasplante, el contenido intracerebral de MSC-EGFP positivas fue mayor cuando esta población celular se integró en el biomaterial. Es posible que el efecto positivo del biomaterial esté relacionado con una mayor eficacia en la retención y localización de las células trasplantadas. Los hidrogeles de fibroína podrían constituir una barrera eficaz para evitar la interacción directa entre las MSC y el tejido huésped, por ejemplo con poblaciones microgliales, que podrían ser responsables de la mayor mortandad de las MSC cuando éstas fueron implantadas sin el biomaterial. Mora Lee y col., emplearon en su estudio un modelo animal inmunodeprimido para reducir la activación microglial ante el trasplante de MSCs 48-72 horas post-ictus (punto temporal empleado para el trasplante, en el cual se producen fenómenos inflamatorios de consideración ([Lan et al 2017](#)) que afectan a la supervivencia de las células trasplantadas), y de este modo favorecer la acción terapéutica esperada ([Mora-Lee et al 2012](#)). Independientemente del mecanismo que pudiera operar (retención, aislamiento...), solo cuando las MSC se integraron en los geles de fibroína se observó un rápido efecto neuroprotector, tan pronto como 96 horas post-implante, reduciendo el daño cerebral causado por la oclusión de la MCA. Estos datos son compatibles con trabajos previos ([Andres et al 2011](#), [Bao et al 2011](#), [Mora-Lee et al 2012](#), [van Velthoven et al 2013](#)) sugiriendo la existencia de una ventana temporal corta (en nuestro estudio al menos 96 horas) a partir de la cual es posible intervenir terapéuticamente para atenuar la segunda ola de daño asociado con fenómenos de excito-toxicidad e inflamación que comúnmente exacerba/extiende la lesión cerebral desde el proceso isquémico inicial. La actividad neuroprotectora de las MSC/P podría deberse también en parte a su actividad inmunomoduladora ([Mora-Lee et al 2012](#)), que no sólo se asocia con una reducción en la inflamación derivada del infarto, sino también con una reducción de la cicatrización ([Li et al 2005](#)).

En algunos estudios de terapia celular, la tardía recuperación funcional post-ictus se ha asociado con fenómenos de integración neuronal y reemplazamiento de la circuitería dañada. Por ejemplo, en un reciente trabajo realizado en ratones infartados (modelo dMCAO), Wang y col., demostraron que el co-trasplante combinado de NSCs con 3K3A-APC (proteasa anticoagulante sanguínea) 7 días después de la cirugía promovía una mejoría funcional de los animales ([Wang et al 2016b](#)). La acción terapéutica observada en su estudio, se debió a la integración funcional en el territorio dañado por el infarto, de poblaciones neuronales derivadas de las NSC trasplantadas. En su estudio, se observó una recuperación de aproximadamente el 50% de la respuesta evocada en la representación originariamente dañada (S₁FL). Además también se produjo un incremento del territorio cortical, como consecuencia de la integración y proliferación de las células trasplantadas. La recuperación de la representación cortical originalmente dañada ha sido también descrita en un

modelo de infarto cortical en ratas ([Ramos-Cabrer et al 2010](#)). En su estudio, Ramos-Cabrer y col. demostraron que el implante de NSCs (línea celular C17.2) en regiones peri-lesionadas, promueve la reaparición de actividad evocada en la corteza somatosensorial dañada al cabo de la séptima-octava semana post-trasplante. Esta actividad emergente fue exclusiva de los animales trasplantados con NSCs, si bien no pudieron, a diferencia del trabajo de Wang y col., demostrar la presencia e integración funcional de las células trasplantadas en el área lesionada. Sin embargo, en nuestro estudio, la recuperación funcional post-ictus exclusiva de los ratones implantados con SF-MSCse asoció mayoritariamente a fenómenos de plasticidad cortical en regiones peri-infartadas y difícilmente se podría explicar por fenómenos de actividad emergente y posible reparación del área lesionada, dado que la actividad evocada en la corteza somatosensorial dañada disminuyó progresivamente a lo largo del tiempo post-infarto.

En los animales que mostraron recuperación funcional post-infarto (SF-MSC), los mecanismos responsables de la nueva actividad sensorial emergente en regiones intactas del campo motor representativo de la extremidad delantera, son desconocidos. Como también ignoramos si la función motora canónica del área motor peri-lesional, fue preservada en su localización original o por el contrario se extendió a regiones adyacentes. Este tipo de remodelación tardía ha sido descrita previamente durante la recuperación funcional espontánea en modelos de infarto de pequeño tamaño ([Brown et al 2009](#), [Harrison et al 2013](#)). Harrison y col., realizaron infartos fototrombóticos en el área somatosensorial (S_1FL) y motora (m_1CFL) representativas de la pata delantera, en regiones donde no había un solapamiento topográfico entre campos sensorimotores. Cuando el infarto se realizó en la región somatosensorial, se observó un desplazamiento de actividad sensorial hacia el campo m_1CFL , que no se observó por el contrario en el grupo control (no infartado) o en cuando el infarto se indujo explícitamente en el campo m_1CFL . Por el contrario, cuando los animales se infartaron en el cortex motor, se observó un desplazamiento del área motora, que no involucró a la región somatosensorial. De forma similar a nuestro estudio, Harrison y col., observaron durante las primeras 6 semanas post-infarto una progresiva disminución de la respuesta en S_1FL y m_1CFL tras el estímulo vibro-táctil de la extremidad delantera, y fue a partir de la 6^a-8^a semana cuando observaron un incremento de respuesta sensorial en la representación el m_1CFL . Este desplazamiento de la función sensorial hacia regiones motoras, no causó en ningún caso la pérdida de la función canónica de este campo, puesto que la fotoestimulación del área m_1CFL produjo una respuesta motora normal. Aunque en nuestro estudio no examinamos el movimiento motor de la extremidad delantera en respuesta a la estimulación eléctrica de la región m_1CFL , sin embargo el test de la rejilla no mostró un incremento en los déficits sensorimotores, pudiéndose inferir que el área m_1CFL intacta debió de mantener su función original. De forma similar, en el trabajo de Brown y col., tras el infarto fototrombótico unilateral en la representación somatosensorial de la pata delantera observaron, en la primera semana post-infarto, una pérdida de la respuesta cortical evocada en dicha región (S_1FL), coincidiendo con los mayores déficits funcionales presentados por los animales, examinados con el test del cilindro. Los animales

mostraron una recuperación significativa de la función en la extremidad paretica, cuyo máximo se alcanzó a la octava semana post-ictus, coincidiendo con una actividad evocada emergente en regiones peri-infartas que involucraron tanto a la corteza somatosensorial del campo representativo de la extremidad posterior (S_1HL), como al cortex motor (m_1CFL). Nuevamente, dicha reorganización cortical no supuso una pérdida de la función original, pues tras la estimulación de la extremidad posterior, se registró una respuesta evocada en su campo representativo somatosensorial (S_1HL).

En ambos estudios, ([Brown et al 2009](#), [Harrison et al 2013](#)), se ha sugerido que el área representativo de la corteza motora m_1CFL es capaz de albergar nuevas representaciones corticales, sin abandonar su territorio cortical, a costa de perder circuitos motores, y ganar aferencias sensoriales. Esta suposición podría ser plausible, al comprender que las neuronas que se encuentran en sitios frontera (entre representaciones somatotípicas), pueden recibir estímulos mixtos y ser maleables ([Winship & Murphy 2008](#)). Asimismo, un probable requerimiento para este tipo de remodelación ("*vicarious process*") puede estar relacionado con la reciprocidad de función entre campos corticales que comparten elementos similares de arquitectura de la red neuronal, independientemente, de si estos campos están involucrados en procesamiento sensorial o motor. En este sentido, el estudio de Matyas y col., muestra como la representación somatosensorial de las vibrisas organizada en columnas corticales, puede también contribuir, en condiciones fisiológicas, al control motor de las mismas ([Matyas et al 2010](#)). Así, la promiscuidad del campo m_1CFL para el procesamiento sensorial y motor no debería sorprender si ambas áreas, sensorial y motora, pueden ser intercambiables entre sí. Una cuestión intrigante hace referencia al sustrato molecular, estructural y celular responsable de la actividad emergente en el campo m_1CFL peri-lesional. Está establecido que tras el ictus, se desencadenan ondas secuenciales de expresión génica en regiones peri-infartadas, provocando la expresión de factores como GAP-43, proteoglicanos condroitin sulfato, metaloproteasas de matriz extracelular, entre otros, relacionados con el crecimiento y el brote axonal en la regeneración del sistema nervioso periférico y el desarrollo cortical ([Carmichael et al 2005](#), [Zhao et al 2006](#)), además de producirse fenómenos de desenmascaramiento de circuitería silente ([Florence et al 1998](#)). Tal y como se ha mencionado anteriormente, la neurotransmisión inhibitoria GABAérgica, es en parte responsable de la organización somatotípica de los territorios corticales, y tras el ictus, su desinhibición contribuye a la remodelación cerebral ([Foeller et al 2005](#), [Hensch 2005](#)), habiéndose descrito como el bloqueo farmacológico de la señalización GABAérgica induce fenómenos de plasticidad cerebral en el orden de días ([Alia et al 2017](#), [Alia et al 2016](#)). En nuestro caso deben concurrir otros factores para explicar la progresiva y tardía actividad sensorial emergente en el campo motor m_1CFL . Entre otros, se han descrito fenómenos de sinaptogénesis, brote y crecimiento axonal, aumento de ramificaciones dendríticas y remodelación de espinas dendríticas como soporte estructural y funcional a la generación de nueva circuitería cortical, principalmente en regiones peri-infartadas ([Carmichael et al 2001](#), [Gonzalez & Kolb 2003](#), [Stroemer et al 1993](#), [Stroemer et al](#)

1995). En estudios con roedores la propagación axonal en áreas peri-lesionadas comienza fuertemente a los 7 días post infarto ([Li et al 2015](#), [Li et al 2010](#), [Overman et al 2012](#)). Un incremento en el “turnover” de espinas dendríticas se ha observado en regiones perilesionales a lo largo de varias semanas tras el ictus, coincidiendo con la fase de progresiva recuperación sensorimotora y espontánea de animales, que alcanzó su máxima significancia entre las 4-6 semanas post-infarto ([Brown et al 2009](#), [Brown et al 2007](#)). En otro estudio, a partir de las tres semanas de infarto y en respuesta al tratamiento con progenitores neurales se observó un incremento de la arborización y la longitud dendrítica en ambos hemisferios, infartado e intacto, asociado con recuperación sensorimotora en el intervalo de 4-6 semanas ([Andres et al 2011](#)).

Al igual que en los trabajos previos, donde se observa una recuperación espontánea tardía ([Brown et al 2009](#), [Brown et al 2007](#)), nuestro estudio empleando células terapéuticas integradas en hidrogeles de fibroína, muestran como la emergente actividad sensorial registrada en el cortex motor (m_1 CFL) a partir de la sexta semana de estudio, correlacionó parcialmente con la disminución de los déficits sensorimotores. Los cambios estructurales anteriormente comentados (sinaptogénesis, brote y crecimiento axonal...), podrían producirse de forma progresiva, desde una remodelación preliminar no dirigida, sin efecto sobre la recuperación de los animales, hasta alcanzar una remodelación cortical efectiva, que como regla general puede tardar semanas. En nuestro caso, desconocemos el papel desempeñado por las MSC/P integradas en fibroína en la recuperación funcional de los animales, así como en la remodelación cortical observada, pudiendo tratarse de fenómenos de neuroprotección ([Leu et al 2010](#), [Meisel et al 2004](#), [Zhu et al 2014](#)) que al reducir el territorio cortical afectado favorecen una remodelación y recuperación de forma espontánea, o bien estimulación de la neurogénesis endógena ([Bao et al 2011](#), [Mora-Lee et al 2012](#), [Song et al 2013](#)), o potenciamiento de la remodelación axonal y dendrítica, así como de la formación de nuevas sinapsis ([Li et al 2006b](#), [Liu et al 2008b](#), [Liu et al 2010](#), [van Velthoven et al 2012](#)). Sin bien es cierto que los fenómenos de reorganización o “*brain remapping*” anteriormente discutidos, se encuentra relacionados con una recuperación espontánea en infartos de pequeño tamaño, e involucran regiones peri-lesionales, adyacentes a la región cortical dañada, esta reestructuración podría ser originada bien por la actividad de neuronas pre-existentes en dicha región perilesionada ([Brown et al 2009](#), [Brown et al 2007](#)), o bien estar favorecida por la integración estructural y funcional de nuevas poblaciones neurales (neuronas, astrocitos, oligodendrocitos..) en circuitos peri-lesionales siendo responsables de los fenómenos de plasticidad ([Shiromoto et al 2017](#)). En cualquier caso, de existir dicha integración funcional, espontánea o estimulada, ésta en principio no se produciría en la región somatosensorial dañada, que como ha sido previamente discutido (**Figura 5.2.**), se caracterizó por la pérdida gradual de su función a lo largo del tiempo post-infarto y tratamiento. Aunque la emergente actividad sensorial en m_1 CFL podría ser explicada por mecanismos compensatorios que favorezcan la formación de nuevas aferencias sensoriales talamo-corticales hacia el cortex motor ([Jones 2017](#)), sin embargo, usando trazadores retrógrados y anterógrados, la deaferenciación sensorial en monos inducida

por fracturas de muñeca o amputaciones de dedos, se ha relacionado con cambios corticales pero no con modificaciones aparentes en las proyecciones talamocorticales ([Florence et al 1998](#)). Este tipo de evidencias ayudan a entender que la reestructuración de los mapas corticales se debe de producir mayoritariamente por modificaciones estructurales y funcionales a nivel intra-cortical.

En resumen, en este estudio hemos demostrado el efecto terapéutico de las MSC integradas en geles de fibroína para reestablecer parcialmente la funcionalidad pérdida tras un daño cerebral afectando al cortex sensorimotor. El efecto terapéutico se debió, en parte, a fenómenos de desconexión funcional entre los campos somatosensorial y motor y a una actividad emergente sensorial en la representación motora correspondiente a la extremidad delantera. Nuestros resultados muestran por primera vez que es posible reorganizar los mapas corticales tras un abordaje terapéutico basado en el uso de células madre, cuya función fue potenciada por su integración en un material inerte como es la fibroína de la seda. Desde el punto de vista traslacional, nuestros resultados son de una extraordinaria importancia, y los hallazgos encontrados durante el desarrollo del presente trabajo de tesis, permiten orientar nuestra investigación hacia la búsqueda racional de terapias dirigidas para promover la reorganización cortical y la neurorestauración cerebral.

VI. CONCLUSIONES

En relación al biomaterial empleado en este trabajo:

1. Los parámetros de sonicación utilizados permitieron la gelificación de soluciones de fibroína en una ventana temporal óptima para la encapsulación celular y el trasplante cerebral. Tras el implante, el retardo en el tiempo de gelificación minimizó el daño tisular que comúnmente ha sido relacionado con al trasplante de biomateriales en estado previo de gel. El hidrogel de fibroína presentó un módulo elástico en el rango del tejido cerebral, favoreciendo la integración y adaptación del biomaterial en el tejido huésped.
2. El implante intra-estriatal de hidrogeles de fibroína produjo una moderada y transitoria respuesta citotóxica e inflamatoria, relacionada con el procedimiento quirúrgico, no ocasionando una mortalidad sustancial de los animales implantados. La presencia del biomaterial en el estriado no originó trastornos sensorimotores ni cognitivos, como tampoco afectó al ciclo vigilia-sueño, a la transmisión somatosensorial o la conectividad inter-hemisférica, avalando la tolerabilidad e inocuidad de la fibroína con la funcionalidad cerebral.
3. La fibroína de la seda demostró poseer una excelente compatibilidad biológica con las células madre de origen mesenquimal, favoreciendo su viabilidad, retención y función terapéutica tras su implante intra-estriatal.

En relación al estudio de la conectividad funcional intra-cortical e inter-hemisférica:

4. En condiciones fisiológicas, la estimulación de la extremidad delantera produjo en el hemisferio contralateral una respuesta en el área motora correspondiente a dicha extremidad, que fue circuitalmente dependiente de la actividad previa en el campo somatosensorial, sugiriendo la existencia de retroalimentación sensorial entre ambos campos corticales. Por otro lado, dicha estimulación condujo a la activación posterior y simultánea de los campos somatosensorial y motor del hemisferio opuesto, ipsilateral a la extremidad estimulada, evidenciando el papel que juega la conectividad inter-hemisférica en la integración de la información somatosensorial procedente de ambas extremidades.
5. El infarto cerebral unilateral inducido en los ratones lesionó la corteza somatosensorial y en menor medida el área motora, causando trastornos sustanciales de la coordinación sensorial y motora en la extremidad anterior afectada, contralateral al hemisferio infartado. Asimismo, se produjo la abolición prácticamente completa y permanente de la respuesta contralateral evocada en el hemisferio dañado, así como fenómenos de hiperexcitabilidad en el hemisferio sano. Los potenciales provocados ipsilaterales se redujeron en ambos hemisferios (intacto y dañado), denotando la existencia de alteraciones en la conectividad inter-hemisférica. La variabilidad y severidad de las alteraciones encontradas fueron dependientes de la cepa de ratón utilizada.

En relación al estudio de la eficacia terapéutica de las células mesenquimales integradas en hidrogeles de fibroína:

6. Solo los animales infartados implantados con células y fibroína mostraron, desde los primeros días post-tratamiento, un menor daño cerebral y una preservación parcial de la actividad evocada en la corteza somatosensorial y motora. A lo largo de las semanas, se observaron únicamente en este grupo de animales, fenómenos de remodelación cerebral consistentes en una actividad sensorial emergente en el mapa motor representativo de la extremidad afectada, que se relacionó con la recuperación sensorimotora y progresiva de los animales.

COROLARIO

Tomados en su conjunto, los resultados obtenidos en esta memoria han permitido desarrollar un nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento del ictus, basado en el implante de células madre integradas en hidrogeles de fibroína de la seda. Este abordaje presenta interés en sí mismo para el desarrollo de otras terapias avanzadas en este campo, así como el uso de biomateriales alternativos como soporte a la función terapéutica de células con actividad neuro-protectora y neuro-restaurativa.

Por otro lado, en este estudio se ha demostrado por primera vez, que es posible inducir remodelación funcional entre diferentes campos corticales tras un tratamiento específico con células madre, siendo esta reorganización funcional, sustrato para la neuro-restauración cerebral post-ictus.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbruzzese G, Berardelli A. 2003. Sensorimotor integration in movement disorders. *Mov Disord* 18: 231-40
- Adil MM, Vazin T, Ananthanarayanan B, Rodrigues GMC, Rao AT, et al. 2017. Engineered hydrogels increase the post-transplantation survival of encapsulated hESC-derived midbrain dopaminergic neurons. *Biomaterials* 136: 1-11
- Adkins DL, Voorhies AC, Jones TA. 2004. Behavioral and neuroplastic effects of focal endothelin-1 induced sensorimotor cortex lesions. *Neuroscience* 128: 473-86
- Aebischer P, Goddard M, Signore AP, Timpson RL. 1994. Functional recovery in hemiparkinsonian primates transplanted with polymer-encapsulated PC12 cells. *Exp Neurol* 126: 151-8
- Aguado BA, Mulyasmita W, Su J, Lampe KJ, Heilshorn SC. 2012. Improving viability of stem cells during syringe needle flow through the design of hydrogel cell carriers. *Tissue Eng Part A* 18: 806-15
- Albers GW, Goldstein LB, Hess DC, Wechsler LR, Furie KL, et al. 2011. Stroke Treatment Academic Industry Roundtable (STAIR) recommendations for maximizing the use of intravenous thrombolytics and expanding treatment options with intra-arterial and neuroprotective therapies. *Stroke* 42: 2645-50
- Albouy G, King BR, Maquet P, Doyon J. 2013. Hippocampus and striatum: dynamics and interaction during acquisition and sleep-related motor sequence memory consolidation. *Hippocampus* 23: 985-1004
- Alexander GE, Crutcher MD. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13: 266-71
- Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR. 1990. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res* 85: 119-46
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL. 1986. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 9: 357-81
- Alia C, Spalletti C, Lai S, Panarese A, Lamola G, et al. 2017. Neuroplastic Changes Following Brain Ischemia and their Contribution to Stroke Recovery: Novel Approaches in Neurorehabilitation. *Front Cell Neurosci* 11: 76
- Alia C, Spalletti C, Lai S, Panarese A, Micera S, Caleo M. 2016. Reducing GABAA-mediated inhibition improves forelimb motor function after focal cortical stroke in mice. *Sci Rep* 6: 37823
- Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, et al. 2003. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24: 401-16
- Altman GH, Horan RL, Lu HH, Moreau J, Martin I, et al. 2002. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials* 23: 4131-41
- Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, et al. 2003. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425: 968-73
- Allison T, McCarthy G, Wood CC, Williamson PD, Spencer DD. 1989. Human cortical potentials evoked by stimulation of the median nerve. II. Cytoarchitectonic areas generating long-latency activity. *J Neurophysiol* 62: 711-22
- Allred RP, Jones TA. 2008. Maladaptive effects of learning with the less-affected forelimb after focal cortical infarcts in rats. *Exp Neurol* 210: 172-81
- Allred RP, Maldonado MA, Hsu, Je, Jones TA. 2005. Training the "less-affected" forelimb after unilateral cortical infarcts interferes with functional recovery of the impaired forelimb in rats. *Restor Neurol Neurosci* 23: 297-302
- Andersson M, Johansson J, Rising A. 2016. Silk Spinning in Silkworms and Spiders. *Int J Mol Sci* 17
- Andres RH, Horie N, Slikker W, Keren-Gill H, Zhan K, et al. 2011. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain. *Brain* 134: 1777-89

- Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, Gupta M, Cui Z, et al. 2011. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 8: 376-88
- Antunes MB, Cohen NA. 2007. Mucociliary clearance--a critical upper airway host defense mechanism and methods of assessment. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7: 5-10
- Aota S, Nagai T, Yamada KM. 1991. Characterization of regions of fibronectin besides the arginine-glycine-aspartic acid sequence required for adhesive function of the cell-binding domain using site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 266: 15938-43
- Aota S, Nomizu M, Yamada KM. 1994. The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J Biol Chem* 269: 24756-61
- Appelros P, Stegmayr B, Terent A. 2010. A review on sex differences in stroke treatment and outcome. *Acta Neurol Scand* 121: 359-69
- Aranguren XL, Pelacho B, Penuelas I, Abizanda G, Uriz M, et al. 2011. MAPC transplantation confers a more durable benefit than AC133+ cell transplantation in severe hind limb ischemia. *Cell Transplant* 20: 259-69
- Arenillas JF, Rovira A, Molina CA, Grive E, Montaner J, Alvarez-Sabin J. 2002. Prediction of early neurological deterioration using diffusion- and perfusion-weighted imaging in hyperacute middle cerebral artery ischemic stroke. *Stroke* 33: 2197-203
- Arias-Rivas S, Vivancos-Mora J, Castillo J. 2012. [Epidemiology of the subtypes of stroke in hospitalised patients attended by neurologists: results of the EPICES registry (I)]. *Rev Neurol* 54: 385-93
- Armand J, Kuypers HG. 1980. Cells of origin of crossed and uncrossed corticospinal fibers in the cat: a quantitative horseradish peroxidase study. *Exp Brain Res* 40: 23-34
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. 2002. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8: 963-70
- Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O. 2001. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci* 14: 10-8
- Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. 1980. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res*: 294-307
- Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA. 1977. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 8: 51-7
- Augestad IL, Nyman AKG, Costa AI, Barnett SC, Sandvig A, et al. 2017. Effects of Neural Stem Cell and Olfactory Ensheathing Cell Co-transplants on Tissue Remodelling After Transient Focal Cerebral Ischemia in the Adult Rat. *Neurochem Res* 42: 1599-609
- Aurand ER, Lampe KJ, Bjugstad KB. 2012. Defining and designing polymers and hydrogels for neural tissue engineering. *Neurosci Res* 72: 199-213
- Back SA, Tuohy TM, Chen H, Wallingford N, Craig A, et al. 2005. Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nat Med* 11: 966-72
- Bai J, Zhong X, Tang H, He Z, Zhang J, Deng J. 2011. [Effect of Integrin alpha5beta1-mediated ERK signal pathway on proliferation and migration of A549 cells]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 14: 568-74
- Bailey EL, Smith C, Sudlow CL, Wardlaw JM. 2011. Is the spontaneously hypertensive stroke prone rat a pertinent model of sub cortical ischemic stroke? A systematic review. *Int J Stroke* 6: 434-44
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. 1995. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 168: 342-57

- Bakshi A, Keck CA, Koshkin VS, LeBold DG, Siman R, et al. 2005. Caspase-mediated cell death predominates following engraftment of neural progenitor cells into traumatically injured rat brain. *Brain Res* 1065: 8-19
- Balakrishnan B, Banerjee R. 2011. Biopolymer-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Chem Rev* 111: 4453-74
- Balkaya M, Krober JM, Rex A, Endres M. 2013. Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 33: 330-8
- Ballios BG, Cooke MJ, Donaldson L, Coles BL, Morshead CM, et al. 2015. A Hyaluronan-Based Injectable Hydrogel Improves the Survival and Integration of Stem Cell Progeny following Transplantation. *Stem Cell Reports* 4: 1031-45
- Banerjee S, Bentley P, Hamady M, Marley S, Davis J, et al. 2014. Intra-Arterial Immunoselected CD34+ Stem Cells for Acute Ischemic Stroke. *Stem Cells Transl Med* 3: 1322-30
- Bang OY, Kim EH, Cha JM, Moon GJ. 2016. Adult Stem Cell Therapy for Stroke: Challenges and Progress. *J Stroke* 18: 256-66
- Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. 2005. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 57: 874-82
- Bao X, Feng M, Wei J, Han Q, Zhao H, et al. 2011. Transplantation of Flk-1+ human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Eur J Neurosci* 34: 87-98
- Barios JA, Pisarchyk L, Fernandez-Garcia L, Barrio LC, Ramos M, et al. 2016. Long-term dynamics of somatosensory activity in a stroke model of distal middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 36: 606-20
- Barth A. 2007. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1767: 1073-101
- Bartoszewicz ZP, Noronha AB, Fujita N, Sato S, Bo L, et al. 1995. Abnormal expression and glycosylation of the large and small isoforms of myelin-associated glycoprotein in dysmyelinating quaking mutants. *J Neurosci Res* 41: 27-38
- Baumann CR, Kilic E, Petit B, Werth E, Hermann DM, et al. 2006. Sleep EEG changes after middle cerebral artery infarcts in mice: different effects of striatal and cortical lesions. *Sleep* 29: 1339-44
- Benowitz LI, Carmichael ST. 2010. Promoting axonal rewiring to improve outcome after stroke. *Neurobiol Dis* 37: 259-66
- Bentsen L, Christensen L, Christensen A, Christensen H. 2014. Outcome and risk factors presented in old patients above 80 years of age versus younger patients after ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 23: 1944-8
- Bernhardt J, Dewey H, Thrift A, Collier J, Donnan G. 2008. A very early rehabilitation trial for stroke (AVERT): phase II safety and feasibility. *Stroke* 39: 390-6
- Bernstock JD, Peruzzotti-Jametti L, Ye D, Gessler FA, Maric D, et al. 2017. Neural stem cell transplantation in ischemic stroke: A role for preconditioning and cellular engineering. *J Cereb Blood Flow Metab* 37: 2314-19
- Bhasin A, Srivastava MV, Mohanty S, Bhatia R, Kumaran SS, Bose S. 2013. Stem cell therapy: a clinical trial of stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 115: 1003-8
- Bianco P. 2014. "Mesenchymal" stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30: 677-704
- Bible E, Chau DY, Alexander MR, Price J, Shakesheff KM, Modo M. 2009. The support of neural stem cells transplanted into stroke-induced brain cavities by PLGA particles. *Biomaterials* 30: 2985-94
- Bible E, Dell'Acqua F, Solanky B, Balducci A, Crapo PM, et al. 2012a. Non-invasive imaging of transplanted human neural stem cells and ECM scaffold remodeling in the stroke-damaged rat brain by (19)F- and diffusion-MRI. *Biomaterials* 33: 2858-71

- Bible E, Qutachi O, Chau DY, Alexander MR, Shakesheff KM, Modo M. 2012b. Neo-vascularization of the stroke cavity by implantation of human neural stem cells on VEGF-releasing PLGA microparticles. *Biomaterials* 33: 7435-46
- Biernaskie J, Chernenko G, Corbett D. 2004. Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. *J Neurosci* 24: 1245-54
- Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, et al. 2002. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2344-9
- Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. 2007. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 38: 817-26
- Bliss TM, Andres RH, Steinberg GK. 2010. Optimizing the success of cell transplantation therapy for stroke. *Neurobiol Dis* 37: 275-83
- Boisserand LS, Kodama T, Papassin J, Auzely R, Moisan A, et al. 2016. Biomaterial Applications in Cell-Based Therapy in Experimental Stroke. *Stem Cells Int* 2016: 6810562
- Boltze J, Arnold A, Walczak P, Jolkonen J, Cui L, Wagner DC. 2015. The Dark Side of the Force - Constraints and Complications of Cell Therapies for Stroke. *Front Neurol* 6: 155
- Borlongan CV, Jolkonen J, Detante O. 2015. The future of stem cell therapy for stroke rehabilitation. *Future Neurol* 10: 313-19
- Braeuninger S, Kleinschnitz C, Nieswandt B, Stoll G. 2012. Focal cerebral ischemia. *Methods Mol Biol* 788: 29-42
- Brea A, Laclaustra M, Martorell E, Pedragosa A. 2013. [Epidemiology of cerebrovascular disease in Spain]. *Clin Investig Arterioscler* 25: 211-7
- Brott T, Adams HP, Jr., Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, et al. 1989. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* 20: 864-70
- Brott T, Bogousslavsky J. 2000. Treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 343: 710-22
- Brown CE, Aminoltejari K, Erb H, Winship IR, Murphy TH. 2009. In vivo voltage-sensitive dye imaging in adult mice reveals that somatosensory maps lost to stroke are replaced over weeks by new structural and functional circuits with prolonged modes of activation within both the peri-infarct zone and distant sites. *J Neurosci* 29: 1719-34
- Brown CE, Li P, Boyd JD, Delaney KR, Murphy TH. 2007. Extensive turnover of dendritic spines and vascular remodeling in cortical tissues recovering from stroke. *J Neurosci* 27: 4101-9
- Brown RD, Whisnant JP, Sicks JD, O'Fallon WM, Wiebers DO. 1996. Stroke incidence, prevalence, and survival: secular trends in Rochester, Minnesota, through 1989. *Stroke* 27: 373-80
- Brunner M, Millon-Fremillon A, Chevalier G, Nakchbandi IA, Mosher D, et al. 2011. Osteoblast mineralization requires beta1 integrin/ICAP-1-dependent fibronectin deposition. *J Cell Biol* 194: 307-22
- Brus-Ramer M, Carmel JB, Martin JH. 2009. Motor cortex bilateral motor representation depends on subcortical and interhemispheric interactions. *J Neurosci* 29: 6196-206
- Bureau I, von Saint Paul F, Svoboda K. 2006. Interdigitated paralemniscal and lemniscal pathways in the mouse barrel cortex. *PLoS Biol* 4: e382
- Bures J, Buresova O, Weiss T, Fifkova E. 1963. Excitability changes in non-specific thalamic nuclei during cortical spreading depression in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 15: 73-83
- Burn JP. 1992. Reliability of the modified Rankin Scale. *Stroke* 23: 438
- Burns TC, Verfaillie CM, Low WC. 2009. Stem cells for ischemic brain injury: a critical review. *J Comp Neurol* 515: 125-44
- Calabrese R, Kaplan DL. 2012. Silk ionomers for encapsulation and differentiation of human MSCs. *Biomaterials* 33: 7375-85

- Calabrese R, Raia N, Huang W, Ghezzi CE, Simon M, et al. 2016. Silk-ionomer and silk-tropoelastin hydrogels as charged three-dimensional culture platforms for the regulation of hMSC response. *J Tissue Eng Regen Med*
- Calford MB, Tweedale R. 1988. Immediate and chronic changes in responses of somatosensory cortex in adult flying-fox after digit amputation. *Nature* 332: 446-8
- Campbell BC, Mitchell PJ. 2015. Endovascular therapy for ischemic stroke. *N Engl J Med* 372: 2365-6
- Cao Y, Liu F, Chen Y, Yu T, Lou D, et al. 2017. Drug release from core-shell PVA/silk fibroin nanoparticles fabricated by one-step electrospraying. *Sci Rep* 7: 11913
- Cargill R, Kohama SG, Struve J, Su W, Banine F, et al. 2012. Astrocytes in aged nonhuman primate brain gray matter synthesize excess hyaluronan. *Neurobiol Aging* 33: 830 e13-24
- Carmichael ST. 2005. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* 2: 396-409
- Carmichael ST. 2006. Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves. *Ann Neurol* 59: 735-42
- Carmichael ST. 2008. Themes and strategies for studying the biology of stroke recovery in the poststroke epoch. *Stroke* 39: 1380-8
- Carmichael ST. 2016. Emergent properties of neural repair: elemental biology to therapeutic concepts. *Ann Neurol* 79: 895-906
- Carmichael ST, Archibeque I, Luke L, Nolan T, Momiy J, Li S. 2005. Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex. *Exp Neurol* 193: 291-311
- Carmichael ST, Chesselet MF. 2002. Synchronous neuronal activity is a signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult. *J Neurosci* 22: 6062-70
- Carmichael ST, Wei L, Rovainen CM, Woolsey TA. 2001. New patterns of intracortical projections after focal cortical stroke. *Neurobiol Dis* 8: 910-22
- Castro-Alamancos MA, Borrel J. 1995. Functional recovery of forelimb response capacity after forelimb primary motor cortex damage in the rat is due to the reorganization of adjacent areas of cortex. *Neuroscience* 68: 793-805
- Castro-Alamancos MA, Connors BW. 1997. Thalamocortical synapses. *Prog Neurobiol* 51: 581-606
- Catala-Lopez F, Fernandez de Larrea-Baz N, Morant-Ginestar C, Alvarez-Martin E, Diaz-Guzman J, Genova-Maleras R. 2015. The national burden of cerebrovascular diseases in Spain: a population-based study using disability-adjusted life years. *Med Clin (Barc)* 144: 353-9
- Causin F, Pascarella R, Pavesi G, Marasco R, Zambon G, et al. 2011. Acute endovascular treatment (< 48 hours) of uncoilable ruptured aneurysms at non-branching sites using silk flow-diverting devices. *Interv Neuroradiol* 17: 357-64
- Cicinelli P, Traversa R, Rossini PM. 1997. Post-stroke reorganization of brain motor output to the hand: a 2-4 month follow-up with focal magnetic transcranial stimulation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 105: 438-50
- Clark IA. 2016. Letter by Clark Regarding Article, "Clinical Outcomes of Transplanted Modified Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Stroke: A Phase 1/2a Study". *Stroke* 47: e268
- Clarkson AN, Huang BS, Macisaac SE, Mody I, Carmichael ST. 2010. Reducing excessive GABA-mediated tonic inhibition promotes functional recovery after stroke. *Nature* 468: 305-9
- Clarkson AN, Lopez-Valdes HE, Overman JJ, Charles AC, Brennan KC, Thomas Carmichael S. 2013. Multimodal examination of structural and functional remapping in the mouse photothrombotic stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 33: 716-23
- Cobacho N, Serano AB, Casarejos MJ, Mena MA, Paino CL. 2009. Use of transduced adipose tissue stromal cells as biologic minipumps to deliver levodopa for the treatment of neuropathic pain: possibilities and limitations. *Cell Transplant* 18: 1341-58

- Cohen NJ, Squire LR. 1980. Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science* 210: 207-10
- Colie S, Sarroca S, Palenzuela R, Garcia I, Matheu A, et al. 2017. Neuronal p38alpha mediates synaptic and cognitive dysfunction in an Alzheimer's mouse model by controlling beta-amyloid production. *Sci Rep* 7: 45306
- Collins LM, Begeti F, Panin F, Lazar AS, Cruickshank T, et al. 2015. Novel Nut and Bolt Task Quantifies Motor Deficits in Premanifest and Manifest Huntington's Disease. *PLoS Curr* 7
- Combs HL, Jones TA, Kozlowski DA, Adkins DL. 2016. Combinatorial Motor Training Results in Functional Reorganization of Remaining Motor Cortex after Controlled Cortical Impact in Rats. *J Neurotrauma* 33: 741-7
- Cook DJ, Nguyen C, Chun HN, I LL, Chiu AS, et al. 2017. Hydrogel-delivered brain-derived neurotrophic factor promotes tissue repair and recovery after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 37: 1030-45
- Cooper JA, Jr., Sahota JS, Gorum WJ, 2nd, Carter J, Doty SB, Laurencin CT. 2007. Biomimetic tissue-engineered anterior cruciate ligament replacement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3049-54
- Corbetta D, Imeri F, Gatti R. 2015. Rehabilitation that incorporates virtual reality is more effective than standard rehabilitation for improving walking speed, balance and mobility after stroke: a systematic review. *J Physiother* 61: 117-24
- Costall B, Holmes SW, Kelly ME, Naylor RJ. 1985. Modification of dyskinesias following the intrastriatal injection of prostaglandins in the rodent. *Br J Pharmacol* 85: 943-9
- Coyne TM, Marcus AJ, Reynolds K, Black IB, Woodbury D. 2007. Disparate host response and donor survival after the transplantation of mesenchymal or neuroectodermal cells to the intact rodent brain. *Transplantation* 84: 1507-16
- Coyne TM, Marcus AJ, Woodbury D, Black IB. 2006. Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia. *Stem Cells* 24: 2483-92
- Crabtree JW, Collingridge GL, Isaac JT. 1998. A new intrathalamic pathway linking modality-related nuclei in the dorsal thalamus. *Nat Neurosci* 1: 389-94
- Crabtree JW, Isaac JT. 2002. New intrathalamic pathways allowing modality-related and cross-modality switching in the dorsal thalamus. *J Neurosci* 22: 8754-61
- Craig CL. 1997. Evolution of arthropod silks. *Annu Rev Entomol* 42: 231-67
- Cramer SC. 2003. Functional magnetic resonance imaging in stroke recovery. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 14: S47-55
- Cramer SC. 2008. Repairing the human brain after stroke: I. Mechanisms of spontaneous recovery. *Ann Neurol* 63: 272-87
- Cui LL, Kerkela E, Bakreen A, Nitzsche F, Andrzejewska A, et al. 2015. The cerebral embolism evoked by intra-arterial delivery of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells in rats is related to cell dose and infusion velocity. *Stem Cell Res Ther* 6: 11
- Cutler SM, Garcia AJ. 2003. Engineering cell adhesive surfaces that direct integrin alpha5beta1 binding using a recombinant fragment of fibronectin. *Biomaterials* 24: 1759-70
- Cha Y, Lee SH, Jang SK, Guo H, Ban YH, et al. 2017. A silk peptide fraction restores cognitive function in AF64A-induced Alzheimer disease model rats by increasing expression of choline acetyltransferase gene. *Toxicol Appl Pharmacol* 314: 48-54
- Chang CY, Chan AT, Armstrong PA, Luo HC, Higuchi T, et al. 2012. Hyaluronic acid-human blood hydrogels for stem cell transplantation. *Biomaterials* 33: 8026-33
- Chao OY, Pum ME, Li JS, Huston JP. 2012. The grid-walking test: assessment of sensorimotor deficits after moderate or severe dopamine depletion by 6-hydroxydopamine lesions in the dorsal striatum and medial forebrain bundle. *Neuroscience* 202: 318-25
- Chapman CD, Frey WH, 2nd, Craft S, Danielyan L, Hallschmid M, et al. 2013. Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharm Res* 30: 2475-84

- Chen J, Altman GH, Karageorgiou V, Horan R, Collette A, et al. 2003a. Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses on RGD-modified silk fibers. *J Biomed Mater Res A* 67: 559-70
- Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, et al. 2003b. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res* 73: 778-86
- Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, et al. 2001. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32: 1005-11
- Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, Xu YX, et al. 2003c. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res* 92: 692-9
- Chen SJ, Chang CM, Tsai SK, Chang YL, Chou SJ, et al. 2010. Functional improvement of focal cerebral ischemia injury by subdural transplantation of induced pluripotent stem cells with fibrin glue. *Stem Cells Dev* 19: 1757-67
- Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD. 1986. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17: 738-43
- Cheng SY, Seo J, Huang BT, Napolitano T, Champeil E. 2016. Mitomycin C and decarbamoyl mitomycin C induce p53-independent p21WAF1/CIP1 activation. *Int J Oncol* 49: 1815-24
- Cherry AB, Daley GQ. 2013. Reprogrammed cells for disease modeling and regenerative medicine. *Annu Rev Med* 64: 277-90
- Cho WH, Park JC, Chung C, Jeon WK, Han JS. 2014. Learning strategy preference of 5XFAD transgenic mice depends on the sequence of place/spatial and cued training in the water maze task. *Behav Brain Res* 273: 116-22
- Choi DY, Liu M, Hunter RL, Cass WA, Pandya JD, et al. 2009. Striatal neuroinflammation promotes Parkinsonism in rats. *PLoS One* 4: e5482
- Chou J, Harvey BK, Chang CF, Shen H, Morales M, Wang Y. 2006. Neuroregenerative effects of BMP7 after stroke in rats. *J Neurol Sci* 240: 21-9
- Chu K, Jung KH, Lee ST, Park HK, Sinn DI, et al. 2008. Circulating endothelial progenitor cells as a new marker of endothelial dysfunction or repair in acute stroke. *Stroke* 39: 1441-7
- Chu K, Kim M, Park KI, Jeong SW, Park HK, et al. 2004. Human neural stem cells improve sensorimotor deficits in the adult rat brain with experimental focal ischemia. *Brain Res* 1016: 145-53
- Dalton PD, Mey J. 2009. Neural interactions with materials. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14: 769-95
- Dancause N. 2006a. Neurophysiological and anatomical plasticity in the adult sensorimotor cortex. *Rev Neurosci* 17: 561-80
- Dancause N. 2006b. Vicarious function of remote cortex following stroke: recent evidence from human and animal studies. *Neuroscientist* 12: 489-99
- Danielyan L, Schafer R, von Ameln-Mayerhofer A, Buadze M, Geisler J, et al. 2009. Intranasal delivery of cells to the brain. *Eur J Cell Biol* 88: 315-24
- Dao MA, Tate CC, Aizman I, McGrogan M, Case CC. 2011. Comparing the immunosuppressive potency of naive marrow stromal cells and Notch-transfected marrow stromal cells. *J Neuroinflammation* 8: 133
- Darsalia V, Heldmann U, Lindvall O, Kokaia Z. 2005. Stroke-induced neurogenesis in aged brain. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 36: 1790-5
- Darsalia V, Kallur T, Kokaia Z. 2007. Survival, migration and neuronal differentiation of human fetal striatal and cortical neural stem cells grafted in stroke-damaged rat striatum. *Eur J Neurosci* 26: 605-14
- Dazzi F, Marelli-Berg FM. 2008. Mesenchymal stem cells for graft-versus-host disease: close encounters with T cells. *Eur J Immunol* 38: 1479-82

- De Keyser J. 2005. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 58: 653-4; author reply 54-5
- de Los Rios la Rosa F, Khoury J, Kissela BM, Flaherty ML, Alwell K, et al. 2012. Eligibility for Intravenous Recombinant Tissue-Type Plasminogen Activator Within a Population: The Effect of the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) III Trial. *Stroke* 43: 1591-5
- de Tommaso M, Franco G, Ricci K, Montemurno A, Sciricchio V. 2016. Laser Evoked Potentials in Early and Presymptomatic Huntington's Disease. *Behav Neurol* 2016: 8613729
- De Tommaso M, Serpino C, Difruscolo O, Cormio C, Sciricchio V, et al. 2011. Nociceptive inputs transmission in Huntington's disease: a study by laser evoked potentials. *Acta Neurol Belg* 111: 33-40
- Deguchi K, Tsuru K, Hayashi T, Takaishi M, Nagahara M, et al. 2006. Implantation of a new porous gelatin-siloxane hybrid into a brain lesion as a potential scaffold for tissue regeneration. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 1263-73
- DeLong M, Wichmann T. 2009. Update on models of basal ganglia function and dysfunction. *Parkinsonism Relat Disord* 15 Suppl 3: S237-40
- Diez-Tejedor E, del Brutto O, Alvarez Sabin J, Munoz M, Abiusi G. 2001. [Classification of the cerebrovascular diseases. Iberoamerican Cerebrovascular diseases Society]. *Rev Neurol* 33: 455-64
- Dihne M, Hartung HP, Seitz RJ. 2011. Restoring neuronal function after stroke by cell replacement: anatomic and functional considerations. *Stroke* 42: 2342-50
- Dijkhuizen RM, Ren J, Mandeville JB, Wu O, Ozdag FM, et al. 2001. Functional magnetic resonance imaging of reorganization in rat brain after stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12766-71
- Ding Y, Qiao Y, Wang M, Zhang H, Li L, et al. 2016. Enhanced Neuroprotection of Acetyl-11-Keto-beta-Boswellic Acid (AKBA)-Loaded O-Carboxymethyl Chitosan Nanoparticles Through Antioxidant and Anti-Inflammatory Pathways. *Mol Neurobiol* 53: 3842-53
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22: 391-7
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, et al. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-7
- Dreier JP, Reiffurth C. 2015. The stroke-migraine depolarization continuum. *Neuron* 86: 902-22
- Dromerick AW, Lang CE, Birkenmeier R, Hahn MG, Sahrmann SA, Edwards DF. 2006. Relationships between upper-limb functional limitation and self-reported disability 3 months after stroke. *J Rehabil Res Dev* 43: 401-8
- Du F, Garg AV, Kosar K, Majumder S, Kugler DG, et al. 2016. Inflammatory Th17 Cells Express Integrin alphavbeta3 for Pathogenic Function. *Cell reports* 16: 1339-51
- Ebrahimi A, Sadrjavadi K, Hajialyani M, Shokoohinia Y, Fattahi A. 2017. Preparation and characterization of silk fibroin hydrogel as injectable implants for sustained release of Risperidone. *Drug Dev Ind Pharm*: 1-16
- Effenberg A, Stanslowsky N, Klein A, Wesemann M, Haase A, et al. 2015. Striatal Transplantation of Human Dopaminergic Neurons Differentiated From Induced Pluripotent Stem Cells Derived From Umbilical Cord Blood Using Lentiviral Reprogramming. *Cell Transplant* 24: 2099-112
- Elbert T, Sterr A, Flor H, Rockstroh B, Knecht S, et al. 1997. Input-increase and input-decrease types of cortical reorganization after upper extremity amputation in humans. *Exp Brain Res* 117: 161-4
- Emberson J, Lees KR, Lyden P, Blackwell L, Albers G, et al. 2014. Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* 384: 1929-35

- Emerich DF, Silva E, Ali O, Mooney D, Bell W, et al. 2010. Injectable VEGF hydrogels produce near complete neurological and anatomical protection following cerebral ischemia in rats. *Cell Transplant* 19: 1063-71
- Emerich DF, Tracy MA, Ward KL, Figueiredo M, Qian R, et al. 1999. Biocompatibility of poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres implanted into the brain. *Cell Transplant* 8: 47-58
- Encha-Razavi F, Sonigo P. 2003. Features of the developing brain. *Childs Nerv Syst* 19: 426-8
- Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V. 2011. Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. *J Vis Exp*
- Engler AJ, Sweeney HL, Discher DE, Schwarzbauer JE. 2007. Extracellular matrix elasticity directs stem cell differentiation. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 7: 335
- Englund U, Bjorklund A, Wictorin K, Lindvall O, Kokaia M. 2002. Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and integrate into host cortical circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 17089-94
- Enomoto S, Sumi M, Kajimoto K, Nakazawa Y, Takahashi R, et al. 2010. Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material. *J Vasc Surg* 51: 155-64
- Erices A, Conget P, Minguell JJ. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109: 235-42
- Etxebarria J, Sanz-Lazaro S, Hernaez-Moya R, Freire V, Duran JA, et al. 2017. Serum from plasma rich in growth factors regenerates rabbit corneas by promoting cell proliferation, migration, differentiation, adhesion and limbal stemness. *Acta Ophthalmol*
- Fan J, Li Y, Fu X, Li L, Hao X, Li S. 2017. Nonhuman primate models of focal cerebral ischemia. *Neural Regen Res* 12: 321-28
- Farkas T, Kis Z, Toldi J, Wolff JR. 1999. Activation of the primary motor cortex by somatosensory stimulation in adult rats is mediated mainly by associational connections from the somatosensory cortex. *Neuroscience* 90: 353-61
- Farr TD, Whishaw IQ. 2002. Quantitative and qualitative impairments in skilled reaching in the mouse (*Mus musculus*) after a focal motor cortex stroke. *Stroke* 33: 1869-75
- Ferezou I, Haiss F, Gentet LJ, Aronoff R, Weber B, Petersen CC. 2007. Spatiotemporal dynamics of cortical sensorimotor integration in behaving mice. *Neuron* 56: 907-23
- Ferezou I, Matyas F, Petersen CCH. 2009. Imaging the Brain in Action: Real-Time Voltage- Sensitive Dye Imaging of Sensorimotor Cortex of Awake Behaving Mice In *In Vivo Optical Imaging of Brain Function*, ed. RD Frostig. Boca Raton (FL)
- Ferri AL, Ceserani V, Greppi N, Tosetti V, Schiariti M, et al. 2016. Osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells cultured on a scaffold made of silk fibroin and cord blood platelet gel. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* 14: 206-11
- Feys H, Van Hees J, Bruyninckx F, Mercelis R, De Weerd W. 2000. Value of somatosensory and motor evoked potentials in predicting arm recovery after a stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68: 323-31
- Fifkova E. 1966. Thalamic spreading depression in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 20: 68-76
- Fisher SP, Black SW, Schwartz MD, Wilk AJ, Chen TM, et al. 2013. Longitudinal analysis of the electroencephalogram and sleep phenotype in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Brain* 136: 2159-72
- Fleming SM, Ekhtor OR, Ghisays V. 2013. Assessment of sensorimotor function in mouse models of Parkinson's disease. *J Vis Exp*
- Floren M, Bonani W, Dharmarajan A, Motta A, Migliaresi C, Tan W. 2016. Human mesenchymal stem cells cultured on silk hydrogels with variable stiffness and growth factor differentiate into mature smooth muscle cell phenotype. *Acta Biomater* 31: 156-66

- Florence SL, Taub HB, Kaas JH. 1998. Large-scale sprouting of cortical connections after peripheral injury in adult macaque monkeys. *Science* 282: 1117-21
- Foeller E, Celikel T, Feldman DE. 2005. Inhibitory sharpening of receptive fields contributes to whisker map plasticity in rat somatosensory cortex. *J Neurophysiol* 94: 4387-400
- Fournier HN, Dupe-Manet S, Bouvard D, Luton F, Degani S, et al. 2005. Nuclear translocation of integrin cytoplasmic domain-associated protein 1 stimulates cellular proliferation. *Mol Biol Cell* 16: 1859-71
- Frankel MR, Morgenstern LB, Kwiatkowski T, Lu M, Tilley BC, et al. 2000. Predicting prognosis after stroke: a placebo group analysis from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Trial. *Neurology* 55: 952-9
- Frenette PS, Wagner DD. 1996. Adhesion molecules--Part 1. *N Engl J Med* 334: 1526-9
- Freret T, Bouet V, Leconte C, Roussel S, Chazalviel L, et al. 2009. Behavioral deficits after distal focal cerebral ischemia in mice: Usefulness of adhesive removal test. *Behav Neurosci* 123: 224-30
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics* 3: 393-403
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. 1974a. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 17: 331-40
- Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, et al. 1974b. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental hematology* 2: 83-92
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology* 4: 267-74
- Fromm C, Evarts EV. 1982. Pyramidal tract neurons in somatosensory cortex: central and peripheral inputs during voluntary movement. *Brain Res* 238: 186-91
- Fukuda S, del Zoppo GJ. 2003. Models of focal cerebral ischemia in the nonhuman primate. *Ilar J* 44: 96-104
- Garcia-Bonilla L, Rosell A, Torregrosa G, Salom JB, Alborch E, et al. 2011. Recommendations guide for experimental animal models in stroke research. *Neurologia* 26: 105-10
- Garcia-Ortiz R, Misseroni S, Zolezzi J. 1993. [Clinical profile of arterial hypertension in patients with cerebrovascular diseases]. *Rev Med Chil* 121: 1017-23
- Garcia JH. 1984. Experimental ischemic stroke: a review. *Stroke* 15: 5-14
- Ge J, Guo L, Wang S, Zhang Y, Cai T, et al. 2014. The size of mesenchymal stem cells is a significant cause of vascular obstructions and stroke. *Stem Cell Rev* 10: 295-303
- Ge Z, Yang Q, Xiang X, Liu KZ. 2012. Assessment of silk fibroin for the repair of buccal mucosa in a rat model. *Int J Oral Maxillofac Surg* 41: 673-80
- Gengler S, Mallot HA, Holscher C. 2005. Inactivation of the rat dorsal striatum impairs performance in spatial tasks and alters hippocampal theta in the freely moving rat. *Behav Brain Res* 164: 73-82
- George PM, Steinberg GK. 2015. Novel Stroke Therapeutics: Unraveling Stroke Pathophysiology and Its Impact on Clinical Treatments. *Neuron* 87: 297-309
- Georges PC, Hui JJ, Gombos Z, McCormick ME, Wang AY, et al. 2007. Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G1147-54
- Gervois P, Wolfs E, Ratajczak J, Dillen Y, Vangansewinkel T, et al. 2016. Stem Cell-Based Therapies for Ischemic Stroke: Preclinical Results and the Potential of Imaging-Assisted Evaluation of Donor Cell Fate and Mechanisms of Brain Regeneration. *Med Res Rev* 36: 1080-126

- Gharabaghi A, Kraus D, Leao MT, Spuler M, Walter A, et al. 2014. Coupling brain-machine interfaces with cortical stimulation for brain-state dependent stimulation: enhancing motor cortex excitability for neurorehabilitation. *Front Hum Neurosci* 8: 122
- Ghuman H, Massensini AR, Donnelly J, Kim SM, Medberry CJ, et al. 2016. ECM hydrogel for the treatment of stroke: Characterization of the host cell infiltrate. *Biomaterials* 91: 166-81
- Gilmour D, Knaut H, Maischein HM, Nusslein-Volhard C. 2004. Towing of sensory axons by their migrating target cells in vivo. *Nat Neurosci* 7: 491-2
- Gonchar YA, Johnson PB, Weinberg RJ. 1995. GABA-immunopositive neurons in rat neocortex with contralateral projections to S-I. *Brain Res* 697: 27-34
- Gonzalez-Gomez FJ, Perez-Torre P, DeFelipe A, Vera R, Matute C, et al. 2016. Stroke in young adults: Incidence rate, risk factors, treatment and prognosis. *Rev Clin Esp* 216: 345-51
- Gonzalez-Henares A, Clua-Espuny JL, Gil-Guillen VF, Panisello-Tafalla A, Queralt-Tomas ML, et al. 2016. [Incidence and preventability of haemorrhagic strokes. Results of the Ebrictus register]. *Rev Neurol* 62: 385-95
- Gonzalez-Nieto D, Li L, Kohler A, Ghiaur G, Ishikawa E, et al. 2012. Connexin-43 in the osteogenic BM niche regulates its cellular composition and the bidirectional traffic of hematopoietic stem cells and progenitors. *Blood* 119: 5144-54
- Gonzalez CL, Gharbawie OA, Williams PT, Kleim JA, Kolb B, Whishaw IQ. 2004. Evidence for bilateral control of skilled movements: ipsilateral skilled forelimb reaching deficits and functional recovery in rats follow motor cortex and lateral frontal cortex lesions. *Eur J Neurosci* 20: 3442-52
- Gonzalez CL, Kolb B. 2003. A comparison of different models of stroke on behaviour and brain morphology. *Eur J Neurosci* 18: 1950-62
- Goodwin AE, Pauli BU. 1995. A new adhesion assay using buoyancy to remove non-adherent cells. *J Immunol Methods* 187: 213-9
- Gore A, Li Z, Fung HL, Young JE, Agarwal S, et al. 2011. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471: 63-7
- Gorelick PB, Sacco RL, Smith DB, Alberts M, Mustone-Alexander L, et al. 1999. Prevention of a first stroke: a review of guidelines and a multidisciplinary consensus statement from the National Stroke Association. *Jama* 281: 1112-20
- Gotoh Y, Tsukada M, Minoura N. 1998. Effect of the chemical modification of the arginyl residue in Bombyx mori silk fibroin on the attachment and growth of fibroblast cells. *J Biomed Mater Res* 39: 351-7
- Goyal M, Menon BK, van Zwam WH, Dippel DW, Mitchell PJ, et al. 2016. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet* 387: 1723-31
- Granger CV, Hamilton BB, Gresham GE, Kramer AA. 1989. The stroke rehabilitation outcome study: Part II. Relative merits of the total Barthel index score and a four-item subscore in predicting patient outcomes. *Arch Phys Med Rehabil* 70: 100-3
- Graziano AP, Sancilio A, Bugalter M, Barbosa W, Rodriguez F, et al. 2016. [Cerebrovascular disease in childhood. Case series]. *Arch Argent Pediatr* 114: e5-8
- Greijer AE, van der Wall E. 2004. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 57: 1009-14
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13625-30
- Guan G, Bai L, Zuo B, Li M, Wu Z, et al. 2010. Promoted dermis healing from full-thickness skin defect by porous silk fibroin scaffolds (PSFSs). *Biomed Mater Eng* 20: 295-308
- Guggenmos DJ, Azin M, Barbay S, Mahnken JD, Dunham C, et al. 2013. Restoration of function after brain damage using a neural prosthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 21177-82

- Gutierrez-Fernandez M, Rodriguez-Frutos B, Alvarez-Grech J, Vallejo-Cremades MT, Exposito-Alcaide M, et al. 2011. Functional recovery after hematic administration of allogenic mesenchymal stem cells in acute ischemic stroke in rats. *Neuroscience* 175: 394-405
- Gutierrez-Fernandez M, Rodriguez-Frutos B, Ramos-Cejudo J, Teresa Vallejo-Cremades M, Fuentes B, et al. 2013. Effects of intravenous administration of allogenic bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke. *Stem Cell Res Ther* 4: 11
- Habib ERMS, Komuro R, Yan P, Hayashi S, Inaji M, et al. 2013. Evaluation of voltage-sensitive fluorescence dyes for monitoring neuronal activity in the embryonic central nervous system. *J Membr Biol* 246: 679-88
- Hairfield-Stein M, England C, Paek HJ, Gilbraith KB, Dennis R, et al. 2007. Development of self-assembled, tissue-engineered ligament from bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 13: 703-10
- Hankey GJ. 2017. Stroke. *Lancet* 389: 641-54
- Harms KM, Li L, Cunningham LA. 2010. Murine neural stem/progenitor cells protect neurons against ischemia by HIF-1alpha-regulated VEGF signaling. *PLoS One* 5: e9767
- Harrison TC, Silasi G, Boyd JD, Murphy TH. 2013. Displacement of sensory maps and disorganization of motor cortex after targeted stroke in mice. *Stroke* 44: 2300-6
- Hatfield RH, Mendelow AD, Perry RH, Alvarez LM, Modha P. 1991. Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as a marker for ischaemic changes in rat brain following permanent middle cerebral artery occlusion. *Neuropathology and applied neurobiology* 17: 61-7
- Hattiangady B, Shuai B, Cai J, Coksaygan T, Rao MS, Shetty AK. 2007. Increased dentate neurogenesis after grafting of glial restricted progenitors or neural stem cells in the aging hippocampus. *Stem Cells* 25: 2104-17
- Hayton SM, Kriss A, Muller DP. 1999. Comparison of the effects of four anaesthetic agents on somatosensory evoked potentials in the rat. *Lab Anim* 33: 243-51
- Hegyí B, Kornyei Z, Ferenczi S, Fekete R, Kudlik G, et al. 2014. Regulation of mouse microglia activation and effector functions by bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 23: 2600-12
- Hemeda H, Giebel B, Wagner W. 2014. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 16: 170-80
- Hensch TK. 2005. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 6: 877-88
- Hernandez TD, Schallert T. 1988. Seizures and recovery from experimental brain damage. *Exp Neurol* 102: 318-24
- Hess DC, Wechsler LR, Clark WM, Savitz SI, Ford GA, et al. 2017. Safety and efficacy of multipotent adult progenitor cells in acute ischaemic stroke (MASTERS): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol*
- Hillen ME, Sage JI. 1996. Nonmotor fluctuations in patients with Parkinson's disease. *Neurology* 47: 1180-3
- Hinzman JM, DiNapoli VA, Mahoney EJ, Gerhardt GA, Hartings JA. 2015. Spreading depolarizations mediate excitotoxicity in the development of acute cortical lesions. *Exp Neurol* 267: 243-53
- Hira R, Ohkubo F, Ozawa K, Isomura Y, Kitamura K, et al. 2013. Spatiotemporal dynamics of functional clusters of neurons in the mouse motor cortex during a voluntary movement. *J Neurosci* 33: 1377-90
- Hira R, Terada S, Kondo M, Matsuzaki M. 2015. Distinct Functional Modules for Discrete and Rhythmic Forelimb Movements in the Mouse Motor Cortex. *J Neurosci* 35: 13311-22
- Ho SS, Murphy KC, Binder BY, Vissers CB, Leach JK. 2016. Increased Survival and Function of Mesenchymal Stem Cell Spheroids Entrapped in Instructive Alginate Hydrogels. *Stem Cells Transl Med* 5: 773-81

- Hoare B, Imms C, Carey L, Wasiak J. 2007. Constraint-induced movement therapy in the treatment of the upper limb in children with hemiplegic cerebral palsy: a Cochrane systematic review. *Clin Rehabil* 21: 675-85
- Hoban DB, Newland B, Moloney TC, Howard L, Pandit A, Dowd E. 2013. The reduction in immunogenicity of neurotrophin overexpressing stem cells after intra-striatal transplantation by encapsulation in an in situ gelling collagen hydrogel. *Biomaterials* 34: 9420-9
- Hoehn BD, Palmer TD, Steinberg GK. 2005. Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. *Stroke* 36: 2718-24
- Honarmandi P, Lee H, Lang MJ, Kamm RD. 2011. A microfluidic system with optical laser tweezers to study mechanotransduction and focal adhesion recruitment. *Lab Chip* 11: 684-94
- Honmou O, Onodera R, Sasaki M, Waxman SG, Kocsis JD. 2012. Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke. *Trends Mol Med* 18: 292-7
- Horie N, Pereira MP, Niizuma K, Sun G, Keren-Gill H, et al. 2011. Transplanted stem cell-secreted vascular endothelial growth factor effects poststroke recovery, inflammation, and vascular repair. *Stem Cells* 29: 274-85
- Horwitz AF. 1997. Integrins and health. *Sci Am* 276: 68-75
- Hou S, Xu Q, Tian W, Cui F, Cai Q, et al. 2005. The repair of brain lesion by implantation of hyaluronic acid hydrogels modified with laminin. *J Neurosci Methods* 148: 60-70
- Hsieh JY, Wang HW, Chang SJ, Liao KH, Lee IH, et al. 2013. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis. *PLoS One* 8: e72604
- Hsuan YC, Lin CH, Chang CP, Lin MT. 2016. Mesenchymal stem cell-based treatments for stroke, neural trauma, and heat stroke. *Brain Behav* 6: e00526
- Hu A, Zuo B, Zhang F, Lan Q, Zhang H. 2012. Electrospun silk fibroin nanofibers promote Schwann cell adhesion, growth and proliferation. *Neural Regen Res* 7: 1171-8
- Hu X, Yu SP, Fraser JL, Lu Z, Ogle ME, et al. 2008. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 135: 799-808
- Hu Y, Le H, Jin Z, Chen X, Yin Z, et al. 2016. [Application of silk-based tissue engineering scaffold for tendon / ligament regeneration]. *Zhejiang da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Zhejiang University. Medical sciences* 45: 152-60
- Huang J, Li Y, Tang Y, Tang G, Yang GY, Wang Y. 2013. CXCR4 antagonist AMD3100 protects blood-brain barrier integrity and reduces inflammatory response after focal ischemia in mice. *Stroke* 44: 190-7
- Huang S, Ingber DE. 1999. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol* 1: E131-8
- Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, et al. 2008a. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 26: 795-7
- Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, et al. 2008b. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26: 1269-75
- Hussain ST, Attilo A, Bigotte L, Cesarini K, Olsson Y. 1985. Cytofluorescence localization of propidium iodide injected intravenously into the nervous system of the mouse. *Acta Neuropathol* 66: 62-7
- Hynes RO. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25
- Inden M, Kim DH, Qi M, Kitamura Y, Yanagisawa D, et al. 2005. Transplantation of mouse embryonic stem cell-derived neurons into the striatum, subthalamic nucleus and

- substantia nigra, and behavioral recovery in hemiparkinsonian rats. *Neurosci Lett* 387: 151-6
- Inoue S, Tanaka K, Arisaka F, Kimura S, Ohtomo K, Mizuno S. 2000. Silk fibroin of Bombyx mori is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J Biol Chem* 275: 40517-28
- Inoue T, Sugiyama M, Hattori H, Wakita H, Wakabayashi T, Ueda M. 2013. Stem cells from human exfoliated deciduous tooth-derived conditioned medium enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats. *Tissue Eng Part A* 19: 24-9
- Iosif RE, Ahlenius H, Ekdahl CT, Darsalia V, Thored P, et al. 2008. Suppression of stroke-induced progenitor proliferation in adult subventricular zone by tumor necrosis factor receptor 1. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 1574-87
- Isayama K, Pitts LH, Nishimura MC. 1991. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining to delineate rat brain infarcts. *Stroke* 22: 1394-8
- Ishizaka S, Horie N, Satoh K, Fukuda Y, Nishida N, Nagata I. 2013. Intra-arterial cell transplantation provides timing-dependent cell distribution and functional recovery after stroke. *Stroke* 44: 720-6
- Ito M, Shichinohe H, Houkin K, Kuroda S. 2017. Application of cell sheet technology to bone marrow stromal cell transplantation for rat brain infarct. *J Tissue Eng Regen Med* 11: 375-81
- Jacobs KM, Donoghue JP. 1991. Reshaping the cortical motor map by unmasking latent intracortical connections. *Science* 251: 944-7
- Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Eldredge JH. 1951. Recovery from radiation injury. *Science* 113: 510-11
- Jaillard A, Martin CD, Garambois K, Lebas JF, Hommel M. 2005. Vicarious function within the human primary motor cortex? A longitudinal fMRI stroke study. *Brain* 128: 1122-38
- Jankowska E, Lundberg A, Rudomin P, Sykova E. 1982. Effects of 4-aminopyridine on synaptic transmission in the cat spinal cord. *Brain Res* 240: 117-29
- Janowski M, Walczak P, Date I. 2010. Intravenous route of cell delivery for treatment of neurological disorders: a meta-analysis of preclinical results. *Stem Cells Dev* 19: 5-16
- Jellema T, Brunia CH, Wadman WJ. 2004. Sequential activation of microcircuits underlying somatosensory-evoked potentials in rat neocortex. *Neuroscience* 129: 283-95
- Jendelova P, Kubinova S, Sandvig I, Erceg S, Sandvig A, Sykova E. 2016. Current developments in cell- and biomaterial-based approaches for stroke repair. *Expert Opin Biol Ther* 16: 43-56
- Jenkins WM, Merzenich MM, Ochs MT, Allard T, Guic-Robles E. 1990. Functional reorganization of primary somatosensory cortex in adult owl monkeys after behaviorally controlled tactile stimulation. *J Neurophysiol* 63: 82-104
- Jeong CH, Kim SM, Lim JY, Ryu CH, Jun JA, Jeun SS. 2014. Mesenchymal stem cells expressing brain-derived neurotrophic factor enhance endogenous neurogenesis in an ischemic stroke model. *Biomed Res Int* 2014: 129145
- Jha AK, Tharp KM, Ye J, Santiago-Ortiz JL, Jackson WM, et al. 2015. Enhanced survival and engraftment of transplanted stem cells using growth factor sequestering hydrogels. *Biomaterials* 47: 1-12
- Jiang M, Lv L, Ji H, Yang X, Zhu W, et al. 2011. Induction of pluripotent stem cells transplantation therapy for ischemic stroke. *Mol Cell Biochem* 354: 67-75
- Jimenez-Martin J, Blanco-Lezcano L, Gonzalez-Fraguela ME, Diaz-Hung ML, Serrano-Sanchez T, et al. 2015. Effect of neurotoxic lesion of pedunculopontine nucleus in nigral and striatal redox balance and motor performance in rats. *Neuroscience* 289: 300-14
- Jin K, Mao X, Xie L, Galvan V, Lai B, et al. 2010a. Transplantation of human neural precursor cells in Matrigel scaffolding improves outcome from focal cerebral ischemia after delayed postischemic treatment in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 534-44

- Jin K, Mao X, Xie L, Greenberg RB, Peng B, et al. 2010b. Delayed transplantation of human neural precursor cells improves outcome from focal cerebral ischemia in aged rats. *Aging Cell* 9: 1076-83
- Jin K, Minami M, Xie L, Sun Y, Mao XO, et al. 2004. Ischemia-induced neurogenesis is preserved but reduced in the aged rodent brain. *Aging Cell* 3: 373-7
- Johnston DG, Denizet M, Mostany R, Portera-Cailliau C. 2013. Chronic in vivo imaging shows no evidence of dendritic plasticity or functional remapping in the contralesional cortex after stroke. *Cereb Cortex* 23: 751-62
- Jones EG. 1993. GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cereb Cortex* 3: 361-72
- Jones TA. 2017. Motor compensation and its effects on neural reorganization after stroke. *Nat Rev Neurosci* 18: 267-80
- Jones TA, Allred RP, Adkins DL, Hsu JE, O'Bryant A, Maldonado MA. 2009. Remodeling the brain with behavioral experience after stroke. *Stroke* 40: S136-8
- Jung YJ, Kim KC, Heo JY, Jing K, Lee KE, et al. 2015. Induction of Angiogenesis by Matrigel Coating of VEGF-Loaded PEG/PCL-Based Hydrogel Scaffolds for hBMSC Transplantation. *Mol Cells* 38: 663-8
- Kambe Y, Yamamoto K, Kojima K, Tamada Y, Tomita N. 2010. Effects of RGDS sequence genetically interfused in the silk fibroin light chain protein on chondrocyte adhesion and cartilage synthesis. *Biomaterials* 31: 7503-11
- Kamei N, Tanaka N, Oishi Y, Hamasaki T, Nakanishi K, et al. 2007. BDNF, NT-3, and NGF released from transplanted neural progenitor cells promote corticospinal axon growth in organotypic cocultures. *Spine (Phila Pa 1976)* 32: 1272-8
- Kaneko N, Sawada M, Sawamoto K. 2017. Mechanisms of neuronal migration in the adult brain. *J Neurochem* 141: 835-47
- Kao YC, Li W, Lai HY, Oyarzabal EA, Lin W, Shih YY. 2014. Dynamic perfusion and diffusion MRI of cortical spreading depolarization in photothrombotic ischemia. *Neurobiol Dis* 71: 131-9
- Karageorgiou V, Tomkins M, Fajardo R, Meinel L, Snyder B, et al. 2006. Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A* 78: 324-34
- Karelina K, Norman GJ, Zhang N, Morris JS, Peng H, DeVries AC. 2009. Social isolation alters neuroinflammatory response to stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5895-900
- Karimi AR, Khodadadi A. 2016. Mechanically Robust 3D Nanostructure Chitosan-Based Hydrogels with Autonomic Self-Healing Properties. *ACS Appl Mater Interfaces* 8: 27254-63
- Kasanetz F, Riquelme LA, O'Donnell P, Murer MG. 2006. Turning off cortical ensembles stops striatal Up states and elicits phase perturbations in cortical and striatal slow oscillations in rat in vivo. *J Physiol* 577: 97-113
- Kasner SE. 2006. Clinical interpretation and use of stroke scales. *Lancet Neurol* 5: 603-12
- Kaverina I, Krylyshkina O, Small JV. 2002. Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 746-61
- Kawai H, Yamashita T, Ohta Y, Deguchi K, Nagotani S, et al. 2010. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 1487-93
- Kelly S, Bliss TM, Shah AK, Sun GH, Ma M, et al. 2004. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11839-44
- Kerr AL, Wolke ML, Bell JA, Jones TA. 2013. Post-stroke protection from maladaptive effects of learning with the non-paretic forelimb by bimanual home cage experience in C57BL/6 mice. *Behav Brain Res* 252: 180-7

- Kessels RP, de Haan EH, Kappelle LJ, Postma A. 2001. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res Brain Res Rev* 35: 295-303
- Kessner SS, Bingel U, Thomalla G. 2016. Somatosensory deficits after stroke: a scoping review. *Top Stroke Rehabil* 23: 136-46
- Keum S, Marchuk DA. 2009. A locus mapping to mouse chromosome 7 determines infarct volume in a mouse model of ischemic stroke. *Circulation. Cardiovascular genetics* 2: 591-8
- Khalili AA, Ahmad MR. 2015. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *Int J Mol Sci* 16: 18149-84
- Kim DH, Viventi J, Amsden JJ, Xiao J, Vigeland L, et al. 2010a. Dissolvable films of silk fibroin for ultrathin conformal bio-integrated electronics. *Nat Mater* 9: 511-7
- Kim DW, Eum WS, Jang SH, Park J, Heo DH, et al. 2011. A transparent artificial dura mater made of silk fibroin as an inhibitor of inflammation in craniotomized rats. *J Neurosurg* 114: 485-90
- Kim MH, Park WH. 2016. Chemically cross-linked silk fibroin hydrogel with enhanced elastic properties, biodegradability, and biocompatibility. *Int J Nanomedicine* 11: 2967-78
- Kim ST, Son HJ, Choi JH, Ji IJ, Hwang O. 2010b. Vertical grid test and modified horizontal grid test are sensitive methods for evaluating motor dysfunctions in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1306: 176-83
- Kim SY, Allred RP, Adkins DL, Tennant KA, Donlan NA, et al. 2015. Experience with the "good" limb induces aberrant synaptic plasticity in the perilesion cortex after stroke. *J Neurosci* 35: 8604-10
- Kim UJ, Park J, Kim HJ, Wada M, Kaplan DL. 2005. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials* 26: 2775-85
- Kimura R, Ohno M. 2009. Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiol Dis* 33: 229-35
- Kitagawa K. 2016. [Pathophysiology of stroke, due to diabetes mellitus]. *Nihon Rinsho* 74 Suppl 2: 278-80
- Kleim JA, Bruneau R, VandenBerg P, MacDonald E, Mulrooney R, Pocock D. 2003. Motor cortex stimulation enhances motor recovery and reduces peri-infarct dysfunction following ischemic insult. *Neurol Res* 25: 789-93
- Kleim JA, Jones TA. 2008. Principles of experience-dependent neural plasticity: implications for rehabilitation after brain damage. *J Speech Lang Hear Res* 51: S225-39
- Knieling M, Metz GA, Antonow-Schlorke I, Witte OW. 2009. Enriched environment promotes efficiency of compensatory movements after cerebral ischemia in rats. *Neuroscience* 163: 759-69
- Kodama T, Honda Y. 1999. Acetylcholine and glutamate release during sleep-wakefulness in the pedunculopontine tegmental nucleus and norepinephrine changes regulated by nitric oxide. *Psychiatry Clin Neurosci* 53: 109-11
- Koh SH, Kim KS, Choi MR, Jung KH, Park KS, et al. 2008. Implantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a neuroprotective therapy for ischemic stroke in rats. *Brain Res* 1229: 233-48
- Koller WC. 1984. Sensory symptoms in Parkinson's disease. *Neurology* 34: 957-9
- Kondziolka D, Steinberg GK, Wechsler L, Meltzer CC, Elder E, et al. 2005. Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J Neurosurg* 103: 38-45
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10711-6
- Kozyrev V, Eysel UT, Jancke D. 2014. Voltage-sensitive dye imaging of transcranial magnetic stimulation-induced intracortical dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 13553-8

- Krishnamurthi RV, Feigin VL, Forouzanfar MH, Mensah GA, Connor M, et al. 2013. Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Glob Health* 1: e259-81
- Krucoff MO, Rahimpour S, Slutzky MW, Edgerton VR, Turner DA. 2016. Enhancing Nervous System Recovery through Neurobiologics, Neural Interface Training, and Neurorehabilitation. *Front Neurosci* 10: 584
- Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM. 1994. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* 25: 1794-8
- Kundu J, Chung YI, Kim YH, Tae G, Kundu SC. 2010. Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release. *Int J Pharm* 388: 242-50
- Kuramatsu JB, Gerner ST, Schellinger PD, Glahn J, Endres M, et al. 2015. Anticoagulant reversal, blood pressure levels, and anticoagulant resumption in patients with anticoagulation-related intracerebral hemorrhage. *Jama* 313: 824-36
- Kuraoka M, Furuta T, Matsuwaki T, Omatsu T, Ishii Y, et al. 2009a. Direct experimental occlusion of the distal middle cerebral artery induces high reproducibility of brain ischemia in mice. *Exp Anim* 58: 19-29
- Kuraoka M, Furuta T, Matsuwaki T, Omatsu T, Ishii Y, et al. 2009b. Direct experimental occlusion of the distal middle cerebral artery induces high reproducibility of brain ischemia in mice. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* 58: 19-29
- Lam J, Lowry WE, Carmichael ST, Segura T. 2014. Delivery of iPS-NPCs to the Stroke Cavity within a Hyaluronic Acid Matrix Promotes the Differentiation of Transplanted Cells. *Adv Funct Mater* 24: 7053-62
- Lan X, Han X, Li Q, Yang QW, Wang J. 2017. Modulators of microglial activation and polarization after intracerebral haemorrhage. *Nat Rev Neurol*
- Laver K, George S, Thomas S, Deutsch JE, Crotty M. 2015. Virtual reality for stroke rehabilitation: an abridged version of a Cochrane review. *Eur J Phys Rehabil Med* 51: 497-506
- Lawrence AD, Watkins LH, Sahakian BJ, Hodges JR, Robbins TW. 2000. Visual object and visuospatial cognition in Huntington's disease: implications for information processing in corticostriatal circuits. *Brain* 123 (Pt 7): 1349-64
- Leach JB, Brown XQ, Jacot JG, Dimilla PA, Wong JY. 2007. Neurite outgrowth and branching of PC12 cells on very soft substrates sharply decreases below a threshold of substrate rigidity. *J Neural Eng* 4: 26-34
- Lee JS, Hong JM, Moon GJ, Lee PH, Ahn YH, Bang OY. 2010a. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells* 28: 1099-106
- Lee SY, Lim JY, Kang EK, Han MK, Bae HJ, Paik NJ. 2010b. Prediction of good functional recovery after stroke based on combined motor and somatosensory evoked potential findings. *J Rehabil Med* 42: 16-20
- Lees JS, Sena ES, Egan KJ, Antonic A, Koblar SA, et al. 2012. Stem cell-based therapy for experimental stroke: a systematic review and meta-analysis. *Int J Stroke* 7: 582-8
- Lei M, Li K, Li B, Gao LN, Chen FM, Jin Y. 2014. Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation. *Biomaterials* 35: 6332-43
- Leisman G, Braun-Benjamin O, Melillo R. 2014. Cognitive-motor interactions of the basal ganglia in development. *Frontiers in systems neuroscience* 8: 16
- Leker RR, Lasri V, Chernoguz D. 2009. Growth factors improve neurogenesis and outcome after focal cerebral ischemia. *J Neural Transm (Vienna)* 116: 1397-402
- Lepski G, Jannes CE, Strauss B, Marie SK, Nikkhah G. 2010. Survival and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells transplanted into the rodent brain are dependent upon microenvironment. *Tissue Eng Part A* 16: 2769-82

- Lesny P, De Croos J, Pradny M, Vacik J, Michalek J, et al. 2002. Polymer hydrogels usable for nervous tissue repair. *J Chem Neuroanat* 23: 243-7
- Leu S, Lin YC, Yuen CM, Yen CH, Kao YH, et al. 2010. Adipose-derived mesenchymal stem cells markedly attenuate brain infarct size and improve neurological function in rats. *J Transl Med* 8: 63
- Levin B, Redmond SL, Rajkhowa R, Eikelboom RH, Marano RJ, Atlas MD. 2010. Preliminary results of the application of a silk fibroin scaffold to otology. *Otolaryngol Head Neck Surg* 142: S33-5
- Levy R, Ruland S, Weinand M, Lowry D, Dafer R, Bakay R. 2008. Cortical stimulation for the rehabilitation of patients with hemiparetic stroke: a multicenter feasibility study of safety and efficacy. *J Neurosurg* 108: 707-14
- Levy RM, Harvey RL, Kissela BM, Winstein CJ, Lutsep HL, et al. 2016. Epidural Electrical Stimulation for Stroke Rehabilitation: Results of the Prospective, Multicenter, Randomized, Single-Blinded Everest Trial. *Neurorehabil Neural Repair* 30: 107-19
- Li C, Vepari C, Jin HJ, Kim HJ, Kaplan DL. 2006a. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27: 3115-24
- Li G, Yu F, Lei T, Gao H, Li P, et al. 2016a. Bone marrow mesenchymal stem cell therapy in ischemic stroke: mechanisms of action and treatment optimization strategies. *Neural Regen Res* 11: 1015-24
- Li H, Ghazanfari R, Zacharaki D, Lim HC, Scheduling S. 2016b. Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci* 1370: 109-18
- Li L, Welser-Alves J, van der Flier A, Boroujerdi A, Hynes RO, Milner R. 2012. An angiogenic role for the alpha5beta1 integrin in promoting endothelial cell proliferation during cerebral hypoxia. *Exp Neurol* 237: 46-54
- Li M, Ogiso M, Minoura N. 2003. Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets. *Biomaterials* 24: 357-65
- Li Q, Liu J, Michaud M, Schwartz ML, Madri JA. 2009a. Strain differences in behavioral and cellular responses to perinatal hypoxia and relationships to neural stem cell survival and self-renewal: Modeling the neurovascular niche. *Am J Pathol* 175: 2133-46
- Li R, Maminishkis A, Zahn G, Vossmeier D, Miller SS. 2009b. Integrin alpha5beta1 mediates attachment, migration, and proliferation in human retinal pigment epithelium: relevance for proliferative retinal disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 5988-96
- Li S, Carmichael ST. 2006. Growth-associated gene and protein expression in the region of axonal sprouting in the aged brain after stroke. *Neurobiol Dis* 23: 362-73
- Li S, Nie EH, Yin Y, Benowitz LI, Tung S, et al. 2015. GDF10 is a signal for axonal sprouting and functional recovery after stroke. *Nat Neurosci* 18: 1737-45
- Li S, Overman JJ, Katsman D, Kozlov SV, Donnelly CJ, et al. 2010. An age-related sprouting transcriptome provides molecular control of axonal sprouting after stroke. *Nat Neurosci* 13: 1496-504
- Li X, Blizzard KK, Zeng Z, DeVries AC, Hurn PD, McCullough LD. 2004. Chronic behavioral testing after focal ischemia in the mouse: functional recovery and the effects of gender. *Exp Neurol* 187: 94-104
- Li X, Liu Y, Zhang J, You R, Qu J, Li M. 2017. Functionalized silk fibroin dressing with topical bioactive insulin release for accelerated chronic wound healing. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 72: 394-404
- Li Y, Chen J, Chopp M. 2001a. Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. *Cell Transplant* 10: 31-40
- Li Y, Chen J, Wang L, Lu M, Chopp M. 2001b. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology* 56: 1666-72

- Li Y, Chen J, Zhang CL, Wang L, Lu D, et al. 2005. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia* 49: 407-17
- Li Y, Chopp M. 2009. Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 456: 120-3
- Li Y, Chopp M, Chen J, Wang L, Gautam SC, et al. 2000. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 1311-9
- Li Y, McIntosh K, Chen J, Zhang C, Gao Q, et al. 2006b. Allogeneic bone marrow stromal cells promote glial-axonal remodeling without immunologic sensitization after stroke in rats. *Exp Neurol* 198: 313-25
- Liang Y, Walczak P, Bulte JW. 2013. The survival of engrafted neural stem cells within hyaluronic acid hydrogels. *Biomaterials* 34: 5521-9
- Liepert J, Hamzei F, Weiller C. 2004. Lesion-induced and training-induced brain reorganization. *Restor Neurol Neurosci* 22: 269-77
- Liepert J, Miltner WH, Bauder H, Sommer M, Dettmers C, et al. 1998. Motor cortex plasticity during constraint-induced movement therapy in stroke patients. *Neurosci Lett* 250: 5-8
- Liepert J, Uhde I, Graf S, Leidner O, Weiller C. 2001. Motor cortex plasticity during forced-use therapy in stroke patients: a preliminary study. *J Neurol* 248: 315-21
- Lim DH, LeDue JM, Mohajerani MH, Murphy TH. 2014. Optogenetic mapping after stroke reveals network-wide scaling of functional connections and heterogeneous recovery of the peri-infarct. *J Neurosci* 34: 16455-66
- Lim DH, Mohajerani MH, Ledue J, Boyd J, Chen S, Murphy TH. 2012. In vivo Large-Scale Cortical Mapping Using Channelrhodopsin-2 Stimulation in Transgenic Mice Reveals Asymmetric and Reciprocal Relationships between Cortical Areas. *Front Neural Circuits* 6: 11
- Lind P, Engstrom G, Stavenow L, Janzon L, Lindgarde F, Hedblad B. 2004. Risk of myocardial infarction and stroke in smokers is related to plasma levels of inflammation-sensitive proteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 577-82
- Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, et al. 2011. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471: 68-73
- Liu J, Burkin DJ, Kaufman SJ. 2008a. Increasing alpha 7 beta 1-integrin promotes muscle cell proliferation, adhesion, and resistance to apoptosis without changing gene expression. *American journal of physiology. Cell physiology* 294: C627-40
- Liu K, Ji K, Guo L, Wu W, Lu H, et al. 2014a. Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvasc Res* 92: 10-8
- Liu L, Cheung TH, Charville GW, Rando TA. 2015. Isolation of skeletal muscle stem cells by fluorescence-activated cell sorting. *Nat Protoc* 10: 1612-24
- Liu X, Ye R, Yan T, Yu SP, Wei L, et al. 2014b. Cell based therapies for ischemic stroke: from basic science to bedside. *Prog Neurobiol* 115: 92-115
- Liu Z, Li Y, Zhang RL, Cui Y, Chopp M. 2011. Bone marrow stromal cells promote skilled motor recovery and enhance contralesional axonal connections after ischemic stroke in adult mice. *Stroke* 42: 740-4
- Liu Z, Li Y, Zhang X, Savant-Bhonsale S, Chopp M. 2008b. Contralesional axonal remodeling of the corticospinal system in adult rats after stroke and bone marrow stromal cell treatment. *Stroke* 39: 2571-7
- Liu Z, Li Y, Zhang ZG, Cui X, Cui Y, et al. 2010. Bone marrow stromal cells enhance inter- and intracortical axonal connections after ischemic stroke in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 1288-95
- Lochhead JJ, Thorne RG. 2012. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev* 64: 614-28

- Locht C, Chesebro B, Race R, Keith JM. 1986. Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 6372-6
- Loh NK, Woerly S, Bunt SM, Wilton SD, Harvey AR. 2001. The regrowth of axons within tissue defects in the CNS is promoted by implanted hydrogel matrices that contain BDNF and CNTF producing fibroblasts. *Exp Neurol* 170: 72-84
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20: 84-91
- Lopez-Verrilli MA, Caviedes A, Cabrera A, Sandoval S, Wyneken U, Khoury M. 2016. Mesenchymal stem cell-derived exosomes from different sources selectively promote neuritic outgrowth. *Neuroscience* 320: 129-39
- Lorca-Puls DL, Gajardo-Vidal A, Seghier ML, Leff AP, Sethi V, et al. 2017. Using transcranial magnetic stimulation of the undamaged brain to identify lesion sites that predict language outcome after stroke. *Brain*
- Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. 1951. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 12: 197-201
- Lovblad KO, Baird AE, Schlaug G, Benfield A, Siewert B, et al. 1997. Ischemic lesion volumes in acute stroke by diffusion-weighted magnetic resonance imaging correlate with clinical outcome. *Ann Neurol* 42: 164-70
- Lu Q, Zhang B, Li M, Zuo B, Kaplan DL, et al. 2011. Degradation mechanism and control of silk fibroin. *Biomacromolecules* 12: 1080-6
- Luan XY, Wang Y, Duan X, Duan QY, Li MZ, et al. 2006. Attachment and growth of human bone marrow derived mesenchymal stem cells on regenerated antheraea pernyi silk fibroin films. *Biomed Mater* 1: 181-7
- Lye RH, Shrewsbury-Gee J, Slater P, Latham A. 1987. Rat middle cerebral artery occlusion: use of evoked potentials and tetrazolium staining to assess chronic ischaemia. *J Neurosci Methods* 22: 133-9
- Ma J, Tian WM, Hou SP, Xu QY, Spector M, Cui FZ. 2007. An experimental test of stroke recovery by implanting a hyaluronic acid hydrogel carrying a Nogo receptor antibody in a rat model. *Biomed Mater* 2: 233-40
- Ma J, Yang F, Both SK, Kersten-Niessen M, Bongio M, et al. 2014. Comparison of cell-loading methods in hydrogel systems. *J Biomed Mater Res A* 102: 935-46
- Macdonell RA, Donnan GA, Bladin PF. 1989. A comparison of somatosensory evoked and motor evoked potentials in stroke. *Ann Neurol* 25: 68-73
- Macrae IM. 2011. Preclinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia. *Br J Pharmacol* 164: 1062-78
- Madsen TE, Khoury JC, Alwell KA, Moomaw CJ, Kissela BM, et al. 2015. Analysis of tissue plasminogen activator eligibility by sex in the Greater Cincinnati/Northern Kentucky Stroke Study. *Stroke* 46: 717-21
- Main JM, Prehn RT. 1955. Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow. *J Natl Cancer Inst* 15: 1023-9
- Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, et al. 2003. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 10: 228-41
- Marini C, Russo T, Felzani G. 2010. Incidence of stroke in young adults: a review. *Stroke Res Treat* 2011: 535672
- Martinez-Mora C, Mrowiec A, Garcia-Vizcaino EM, Alcaraz A, Cenis JL, Nicolas FJ. 2012. Fibroin and sericin from Bombyx mori silk stimulate cell migration through upregulation and phosphorylation of c-Jun. *PLoS One* 7: e42271
- Martinez-Vila E, Irimia P. 2004. The cost of stroke. *Cerebrovasc Dis* 17 Suppl 1: 124-9

- Mas-Moruno C, Fraioli R, Rechenmacher F, Neubauer S, Kapp TG, Kessler H. 2016. alphavbeta3- or alpha5beta1-Integrin-Selective Peptidomimetics for Surface Coating. *Angew Chem Int Ed Engl* 55: 7048-67
- Massensini AR, Ghuman H, Saldin LT, Medberry CJ, Keane TJ, et al. 2015. Concentration-dependent rheological properties of ECM hydrogel for intracerebral delivery to a stroke cavity. *Acta Biomater* 27: 116-30
- Matsumoto A, Chen J, Collette AL, Kim UJ, Altman GH, et al. 2006. Mechanisms of silk fibroin sol-gel transitions. *The journal of physical chemistry. B* 110: 21630-8
- Matyas F, Sreenivasan V, Marbach F, Wacogne C, Barsy B, et al. 2010. Motor control by sensory cortex. *Science* 330: 1240-3
- McLaren A. 2001. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature* 414: 129-31
- McMillan T, Wilson L, Ponsford J, Levin H, Teasdale G, Bond M. 2016. The Glasgow Outcome Scale - 40 years of application and refinement. *Nat Rev Neurol* 12: 477-85
- Mead B, Logan A, Berry M, Leadbeater W, Scheven BA. 2014. Paracrine-mediated neuroprotection and neuritogenesis of axotomised retinal ganglion cells by human dental pulp stem cells: comparison with human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One* 9: e109305
- Meeks JP, Mennerick S. 2007. Action potential initiation and propagation in CA3 pyramidal axons. *J Neurophysiol* 97: 3460-72
- Meinel L, Betz O, Fajardo R, Hofmann S, Nazarian A, et al. 2006. Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. *Bone* 39: 922-31
- Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Kirker-Head C, McCool J, et al. 2005. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials* 26: 147-55
- Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103: 4619-21
- Mena-Segovia J, Cintra L, Prospero-Garcia O, Giordano M. 2002. Changes in sleep-waking cycle after striatal excitotoxic lesions. *Behav Brain Res* 136: 475-81
- Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, et al. 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466: 829-34
- Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. 2004. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 19: 151-67
- Merzenich MM, Nelson RJ, Stryker MP, Cynader MS, Schoppmann A, Zook JM. 1984. Somatosensory cortical map changes following digit amputation in adult monkeys. *J Comp Neurol* 224: 591-605
- Meschia JF, Bushnell C, Boden-Albala B, Braun LT, Bravata DM, et al. 2014. Guidelines for the primary prevention of stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 45: 3754-832
- Meyer J, Salamon A, Herzmann N, Adam S, Kleine HD, et al. 2015. Isolation and differentiation potential of human mesenchymal stem cells from adipose tissue harvested by water jet-assisted liposuction. *Aesthet Surg J* 35: 1030-9
- Miller FD, Gauthier AS. 2007. Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* 54: 357-69
- Miller TW, Zhou C, Gines S, MacDonald ME, Mazarakis ND, et al. 2005. A human single-chain Fv intrabody preferentially targets amino-terminal Huntingtin's fragments in striatal models of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 19: 47-56
- Ming GL, Song H. 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70: 687-702
- Minoura N, Aiba S, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y. 1995a. Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein matrices. *J Biomed Mater Res* 29: 1215-21

- Minoura N, Aiba S, Higuchi M, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y. 1995b. Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin. *Biochem Biophys Res Commun* 208: 511-6
- Mir O, Savitz SI. 2013. Stem cell therapy in stroke treatment: is it a viable option? *Expert Rev Neurother* 13: 119-21
- Mirzaei H. 2017. Stroke in women: Risk factors and clinical biomarkers. *J Cell Biochem*
- Mitrovic N, Caboche J, Carre JB, Besson MJ, Maurin Y. 1991. The quaking mouse: an epileptic mutant with alterations affecting the modulatory mechanisms of the NMDA receptor complex. *Brain Res* 566: 248-54
- Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, et al. 2011. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 8: 633-8
- Mo L, Yang Z, Zhang A, Li X. 2010. The repair of the injured adult rat hippocampus with NT-3-chitosan carriers. *Biomaterials* 31: 2184-92
- Mohajerani MH, Aminoltejari K, Murphy TH. 2011. Targeted mini-strokes produce changes in interhemispheric sensory signal processing that are indicative of disinhibition within minutes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: E183-91
- Mohajerani MH, Chan AW, Mohsenvand M, LeDue J, Liu R, et al. 2013. Spontaneous cortical activity alternates between motifs defined by regional axonal projections. *Nat Neurosci* 16: 1426-35
- Moloney TC, Dockery P, Windebank AJ, Barry FP, Howard L, Dowd E. 2010. Survival and immunogenicity of mesenchymal stem cells from the green fluorescent protein transgenic rat in the adult rat brain. *Neurorehabilitation and neural repair* 24: 645-56
- Moniche F, Gonzalez A, Gonzalez-Marcos JR, Carmona M, Pinero P, et al. 2012. Intra-arterial bone marrow mononuclear cells in ischemic stroke: a pilot clinical trial. *Stroke* 43: 2242-4
- Moon SK, Alaverdashvili M, Cross AR, Whishaw IQ. 2009. Both compensation and recovery of skilled reaching following small photothrombotic stroke to motor cortex in the rat. *Exp Neurol* 218: 145-53
- Mora-Lee S, Sirerol-Piquer MS, Gutierrez-Perez M, Gomez-Pinedo U, Roobrouck VD, et al. 2012. Therapeutic effects of hMAPC and hMSC transplantation after stroke in mice. *PLoS One* 7: e43683
- Morales-Botello ML, Aguilar J, Foffani G. 2012. Imaging the spatio-temporal dynamics of supragranular activity in the rat somatosensory cortex in response to stimulation of the paws. *PLoS One* 7: e40174
- Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, et al. 2009. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *The Journal of experimental medicine* 206: 2483-96
- Morris DM, Taub E. 2001. Constraint-induced therapy approach to restoring function after neurological injury. *Top Stroke Rehabil* 8: 16-30
- Morris RG. 1999. D.O. Hebb: The Organization of Behavior, Wiley: New York; 1949. *Brain Res Bull* 50: 437
- Moshayedi P, Ng G, Kwok JC, Yeo GS, Bryant CE, et al. 2014. The relationship between glial cell mechanosensitivity and foreign body reactions in the central nervous system. *Biomaterials* 35: 3919-25
- Moshayedi P, Nih LR, Llorente IL, Berg AR, Cinkornpumin J, et al. 2016. Systematic optimization of an engineered hydrogel allows for selective control of human neural stem cell survival and differentiation after transplantation in the stroke brain. *Biomaterials* 105: 145-55
- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, et al. 2016. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 133: e38-360
- Murie-Fernandez M, Irimia P, Martinez-Vila E, John Meyer M, Teasell R. 2010. [Neuro-rehabilitation after stroke]. *Neurologia* 25: 189-96

- Murphy MC, Curran GL, Glaser KJ, Rossman PJ, Huston J, 3rd, et al. 2012. Magnetic resonance elastography of the brain in a mouse model of Alzheimer's disease: initial results. *Magn Reson Imaging* 30: 535-9
- Murphy TH, Corbett D. 2009. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 10: 861-72
- Myint PK, Hellkamp AS, Fonarow GC, Reeves MJ, Schwamm LH, et al. 2016. Prior Antithrombotic Use Is Associated With Favorable Mortality and Functional Outcomes in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 47: 2066-74
- Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, et al. 2009. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med* 15: 331-7
- Nair LS, Laurencin CT. 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 32: 762-98
- Nakaji-Hirabayashi T, Kato K, Iwata H. 2013. In vivo study on the survival of neural stem cells transplanted into the rat brain with a collagen hydrogel that incorporates laminin-derived polypeptides. *Bioconjug Chem* 24: 1798-804
- Nakano-Doi A, Nakagomi T, Fujikawa M, Nakagomi N, Kubo S, et al. 2010. Bone marrow mononuclear cells promote proliferation of endogenous neural stem cells through vascular niches after cerebral infarction. *Stem Cells* 28: 1292-302
- Nakashima K, Kanba M, Fujimoto K, Sato T, Takahashi K. 1985. Somatosensory evoked potentials over the non-affected hemisphere in patients with unilateral cerebrovascular lesions. *J Neurol Sci* 70: 117-27
- Nan Z, Grande A, Sanberg CD, Sanberg PR, Low WC. 2005. Infusion of human umbilical cord blood ameliorates neurologic deficits in rats with hemorrhagic brain injury. *Ann N Y Acad Sci* 1049: 84-96
- Nawrotek K, Tylman M, Rudnicka K, Balcerzak J, Kaminski K. 2016. Chitosan-based hydrogel implants enriched with calcium ions intended for peripheral nervous tissue regeneration. *Carbohydr Polym* 136: 764-71
- Nicholas AP, McInnis C, Gupta KB, Snow WW, Love DF, et al. 2002. The fate of biodegradable microspheres injected into rat brain. *Neurosci Lett* 323: 85-8
- Nih LR, Carmichael ST, Segura T. 2016. Hydrogels for brain repair after stroke: an emerging treatment option. *Curr Opin Biotechnol* 40: 155-63
- Nih LR, Sideris E, Carmichael ST, Segura T. 2017. Injection of Microporous Annealing Particle (MAP) Hydrogels in the Stroke Cavity Reduces Gliosis and Inflammation and Promotes NPC Migration to the Lesion. *Adv Mater*
- Nisbet DR, Rodda AE, Horne MK, Forsythe JS, Finkelstein DI. 2009. Neurite infiltration and cellular response to electrospun polycaprolactone scaffolds implanted into the brain. *Biomaterials* 30: 4573-80
- Nishibe M, Barbay S, Guggenmos D, Nudo RJ. 2010. Reorganization of motor cortex after controlled cortical impact in rats and implications for functional recovery. *J Neurotrauma* 27: 2221-32
- Noe-Sebastian E, Balasch-Bernat M, Colomer-Font C, Moliner-Munoz B, Rodriguez Sanchez-Leiva C, et al. 2017. [Disability after stroke: a longitudinal study in moderate and severe stroke patients included in a multidisciplinary rehabilitation program]. *Rev Neurol* 64: 385-92
- Nudo RJ. 2007. Postinfarct cortical plasticity and behavioral recovery. *Stroke* 38: 840-5
- Nudo RJ, Jenkins WM, Merzenich MM. 1990. Repetitive microstimulation alters the cortical representation of movements in adult rats. *Somatosens Mot Res* 7: 463-83
- Nudo RJ, Milliken GW. 1996. Reorganization of movement representations in primary motor cortex following focal ischemic infarcts in adult squirrel monkeys. *J Neurophysiol* 75: 2144-9

- Nudo RJ, Milliken GW, Jenkins WM, Merzenich MM. 1996a. Use-dependent alterations of movement representations in primary motor cortex of adult squirrel monkeys. *J Neurosci* 16: 785-807
- Nudo RJ, Wise BM, SiFuentes F, Milliken GW. 1996b. Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. *Science* 272: 1791-4
- Nunes MC, Roy NS, Keyoung HM, Goodman RR, McKhann G, 2nd, et al. 2003. Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med* 9: 439-47
- O'Donnell P, Grace AA. 1995. Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input. *J Neurosci* 15: 3622-39
- Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, et al. 2006. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26: 10129-40
- Obeso JA, Marti-Masso JF, Carrera N. 1980. Somatosensory evoked potentials: abnormalities with focal brain lesions remote from the primary sensorimotor area. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 49: 59-65
- Oh SW, Harris JA, Ng L, Winslow B, Cain N, et al. 2014. A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature* 508: 207-14
- Ohtaki H, Ylostalo JH, Foraker JE, Robinson AP, Reger RL, et al. 2008. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14638-43
- Ois A, Cuadrado-Godia E, Rodriguez-Campello A, Giralt-Steinhauer E, Jimenez-Conde J, et al. 2013. Relevance of stroke subtype in vascular risk prediction. *Neurology* 81: 575-80
- Oki K, Tatarishvili J, Wood J, Koch P, Wattananit S, et al. 2012. Human-induced pluripotent stem cells form functional neurons and improve recovery after grafting in stroke-damaged brain. *Stem Cells* 30: 1120-33
- Omenetto FG, Kaplan DL. 2010. New opportunities for an ancient material. *Science* 329: 528-31
- Orive G, Anitua E, Pedraz JL, Emerich DF. 2009. Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. *Nat Rev Neurosci* 10: 682-92
- Orset C, Macrez R, Young AR, Panthou D, Angles-Cano E, et al. 2007. Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke* 38: 2771-8
- Osanai T, Kuroda S, Yasuda H, Chiba Y, Maruichi K, et al. 2010. Noninvasive transplantation of bone marrow stromal cells for ischemic stroke: preliminary study with a thermoreversible gelation polymer hydrogel. *Neurosurgery* 66: 1140-7; discussion 47
- Overman JJ, Clarkson AN, Wanner IB, Overman WT, Eckstein I, et al. 2012. A role for ephrin-A5 in axonal sprouting, recovery, and activity-dependent plasticity after stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E2230-9
- Packard MG, Knowlton BJ. 2002. Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci* 25: 563-93
- Pakulska MM, Ballios BG, Shoichet MS. 2012. Injectable hydrogels for central nervous system therapy. *Biomed Mater* 7: 024101
- Panes J, Garcia-Olmo D, Van Assche G, Colombel JF, Reinisch W, et al. 2016. Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet* 388: 1281-90
- Paredes MF, James D, Gil-Perotin S, Kim H, Cotter JA, et al. 2016. Extensive migration of young neurons into the infant human frontal lobe. *Science* 354
- Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM. 2002. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* 52: 802-13

- Park JO, Park DH, Kim SD, Lim DJ, Park JY. 2007. Surgical treatment for acute, severe brain infarction. *J Korean Neurosurg Soc* 42: 326-30
- Park KI, Teng YD, Snyder EY. 2002. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. *Nat Biotechnol* 20: 1111-7
- Pastore D, Pacifici F, Capuani B, Palmirotta R, Dong C, et al. 2017. Sex-Genetic Interaction in the Risk for Cerebrovascular Disease. *Curr Med Chem*
- Patel IM, Chapin JK. 1990. Ketamine effects on somatosensory cortical single neurons and on behavior in rats. *Anesth Analg* 70: 635-44
- Paxinos G, Franklin KBJ. 2004. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.
- Pelacho B, Nakamura Y, Zhang J, Ross J, Heremans Y, et al. 2007. Multipotent adult progenitor cell transplantation increases vascularity and improves left ventricular function after myocardial infarction. *J Tissue Eng Regen Med* 1: 51-9
- Peppas NA, Khademhosseini A. 2016. Make better, safer biomaterials. *Nature* 540: 335-37
- Perea GB, Solanas C, Marí-Buyé N, Madurga R, Agulló-Rueda F, et al. 2016. The apparent variability of silkworm (*Bombyx mori*) silk and its relationship with degumming. *European polymer journal* 78: 129-40
- Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, Halford KW, Pollard MD, et al. 1998. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1142-7
- Peres ASC, Souza VH, Catunda JMY, Mazzeto-Betti KC, Santos-Pontelli TEG, et al. 2017. Can somatosensory electrical stimulation relieve spasticity in post-stroke patients? A TMS pilot study. *Biomed Tech (Berl)*
- Petersen CC, Grinvald A, Sakmann B. 2003. Spatiotemporal dynamics of sensory responses in layer 2/3 of rat barrel cortex measured in vivo by voltage-sensitive dye imaging combined with whole-cell voltage recordings and neuron reconstructions. *J Neurosci* 23: 1298-309
- Phinney DG, Pittenger MF. 2017. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells* 35: 851-58
- Pierschbacher MD, Ruoslahti E. 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309: 30-3
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-7
- Plautz EJ, Barbay S, Frost SB, Friel KM, Dancause N, et al. 2003. Post-infarct cortical plasticity and behavioral recovery using concurrent cortical stimulation and rehabilitative training: a feasibility study in primates. *Neurol Res* 25: 801-10
- Poldrack RA, Packard MG. 2003. Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia* 41: 245-51
- Pothakos K, Kurz MJ, Lau YS. 2009. Restorative effect of endurance exercise on behavioral deficits in the chronic mouse model of Parkinson's disease with severe neurodegeneration. *BMC Neurosci* 10: 6
- Potter W, Kalil RE, Kao WJ. 2008. Biomimetic material systems for neural progenitor cell-based therapy. *Front Biosci* 13: 806-21
- Prasad K, Mohanty S, Bhatia R, Srivastava MV, Garg A, et al. 2012. Autologous intravenous bone marrow mononuclear cell therapy for patients with subacute ischaemic stroke: a pilot study. *Indian J Med Res* 136: 221-8
- Prasad K, Sharma A, Garg A, Mohanty S, Bhatnagar S, et al. 2014a. Intravenous autologous bone marrow mononuclear stem cell therapy for ischemic stroke: a multicentric, randomized trial. *Stroke* 45: 3618-24

- Prasad K, Sharma A, Garg A, Mohanty S, Bhatnagar S, et al. 2014b. Intravenous autologous bone marrow mononuclear stem cell therapy for ischemic stroke: a multicentric, randomized trial. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 45: 3618-24
- Preuss S, Stein W. 2013. Comparison of two voltage-sensitive dyes and their suitability for long-term imaging of neuronal activity. *PLoS One* 8: e75678
- Qiao LY, Huang FJ, Zhao M, Xie JH, Shi J, et al. 2014. A two-year follow-up study of cotransplantation with neural stem/progenitor cells and mesenchymal stromal cells in ischemic stroke patients. *Cell Transplant* 23 Suppl 1: S65-72
- Qiu MH, Vetrivelan R, Fuller PM, Lu J. 2010. Basal ganglia control of sleep-wake behavior and cortical activation. *Eur J Neurosci* 31: 499-507
- Qu J, Wang D, Wang H, Dong Y, Zhang F, et al. 2013. Electrospun silk fibroin nanofibers in different diameters support neurite outgrowth and promote astrocyte migration. *J Biomed Mater Res A* 101: 2667-78
- Radtke C, Allmeling C, Waldmann KH, Reimers K, Thies K, et al. 2011. Spider silk constructs enhance axonal regeneration and remyelination in long nerve defects in sheep. *PLoS One* 6: e16990
- Rallu M, Corbin JG, Fishell G. 2002. Parsing the prosencephalon. *Nat Rev Neurosci* 3: 943-51
- Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. 2010. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med* 363: 147-55
- Ramanathan D, Conner JM, Tuszyński MH. 2006. A form of motor cortical plasticity that correlates with recovery of function after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11370-5
- Ramos-Cabrera P, Justicia C, Wiedermann D, Hoehn M. 2010. Stem cell mediation of functional recovery after stroke in the rat. *PLoS One* 5: e12779
- Rao J, Cheng Y, Liu Y, Ye Z, Zhan B, et al. 2017. A multi-walled silk fibroin/silk sericin nerve conduit coated with poly(lactic-co-glycolic acid) sheath for peripheral nerve regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 73: 319-32
- Ratcliffe E, Glen KE, Naing MW, Williams DJ. 2013. Current status and perspectives on stem cell-based therapies undergoing clinical trials for regenerative medicine: case studies. *Br Med Bull* 108: 73-94
- Reddington AE, Rosser AE, Dunnett SB. 2014. Differentiation of pluripotent stem cells into striatal projection neurons: a pure MSN fate may not be sufficient. *Front Cell Neurosci* 8: 398
- Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, et al. 2001. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19: 1134-40
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18: 399-404
- Reumers V, Deroose CM, Krylyshkina O, Nuyts J, Geraerts M, et al. 2008. Noninvasive and quantitative monitoring of adult neuronal stem cell migration in mouse brain using bioluminescence imaging. *Stem Cells* 26: 2382-90
- Riess P, Zhang C, Saatman KE, Laurer HL, Longhi LG, et al. 2002. Transplanted neural stem cells survive, differentiate, and improve neurological motor function after experimental traumatic brain injury. *Neurosurgery* 51: 1043-52; discussion 52-4
- Roca-Cusachs Coll A, Muñoz Lloret A, de Castellar R, Garrido Costa C. 2008. [Study of the stroke and coronary risks in hypertensive patients over 54 years of age in the primary care practice]. *Rev Clin Esp* 208: 490-8
- Rockwood DN, Preda RC, Yucel T, Wang X, Lovett ML, Kaplan DL. 2011. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nat Protoc* 6: 1612-31
- Rodríguez-Frutos B, Otero-Ortega L, Gutiérrez-Fernández M, Fuentes B, Ramos-Cejudo J, Díez-Tejedor E. 2016. Stem Cell Therapy and Administration Routes After Stroke. *Transl Stroke Res* 7: 378-87

- Rodriguez-Lozano FJ, Garcia-Bernal D, Aznar-Cervantes S, Ros-Roca MA, Alguero MC, et al. 2014. Effects of composite films of silk fibroin and graphene oxide on the proliferation, cell viability and mesenchymal phenotype of periodontal ligament stem cells. *J Mater Sci Mater Med* 25: 2731-41
- Roitbak T, Li L, Cunningham LA. 2008. Neural stem/progenitor cells promote endothelial cell morphogenesis and protect endothelial cells against ischemia via HIF-1 α -regulated VEGF signaling. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 1530-42
- Roloff F, Strauss S, Vogt PM, Bicker G, Radtke C. 2014. Spider silk as guiding biomaterial for human model neurons. *Biomed Res Int* 2014: 906819
- Roof RL, Schielke GP, Ren X, Hall ED. 2001. A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. *Stroke* 32: 2648-57
- Rosca AM, Burlacu A. 2010. Isolation of a mouse bone marrow population enriched in stem and progenitor cells by centrifugation on a Percoll gradient. *Biotechnol Appl Biochem* 55: 199-208
- Rosell A, Agin V, Rahman M, Morancho A, Ali C, et al. 2013. Distal occlusion of the middle cerebral artery in mice: are we ready to assess long-term functional outcome? *Transl Stroke Res* 4: 297-307
- Rossignol J, Boyer C, Thinard R, Remy S, Dugast AS, et al. 2009. Mesenchymal stem cells induce a weak immune response in the rat striatum after allo or xenotransplantation. *J Cell Mol Med* 13: 2547-58
- Rossini PM, Tecchio F, Pizzella V, Lupoi D, Cassetta E, Pasqualetti P. 2001. Interhemispheric differences of sensory hand areas after monohemispheric stroke: MEG/MRI integrative study. *Neuroimage* 14: 474-85
- Ruoslahti E, Noble NA, Kagami S, Border WA. 1994. Integrins. *Kidney Int Suppl* 44: S17-22
- Sacco RL. 1997. Risk factors, outcomes, and stroke subtypes for ischemic stroke. *Neurology* 49: S39-44
- Sacco RL, Benjamin EJ, Broderick JP, Dyken M, Easton JD, et al. 1997. American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Risk factors. *Stroke* 28: 1507-17
- Saeed AO, Newland B, Pandit A, Wang W. 2012. The reverse of polymer degradation: in situ crosslinked gel formation through disulfide cleavage. *Chem Commun (Camb)* 48: 585-7
- Sakatani K, Iizuka H, Young W. 1990. Somatosensory evoked potentials in rat cerebral cortex before and after middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 21: 124-32
- Salmela MB, Mortazavi S, Jagadeesan BD, Broderick DF, Burns J, et al. 2017. ACR Appropriateness Criteria(R) Cerebrovascular Disease. *J Am Coll Radiol* 14: S34-S61
- Salter K, Jutai J, Hartley M, Foley N, Bhogal S, et al. 2006. Impact of early vs delayed admission to rehabilitation on functional outcomes in persons with stroke. *J Rehabil Med* 38: 113-7
- Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener HC, Levy EI, et al. 2015. Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med* 372: 2285-95
- Savitz SI, Dinsmore J, Wu J, Henderson GV, Stieg P, Caplan LR. 2005. Neurotransplantation of fetal porcine cells in patients with basal ganglia infarcts: a preliminary safety and feasibility study. *Cerebrovasc Dis* 20: 101-7
- Savitz SI, Dinsmore JH, Wechsler LR, Rosenbaum DM, Caplan LR. 2004. Cell therapy for stroke. *NeuroRx* 1: 406-14
- Savopoulos C, Kaiafa G, Kanellos I, Fountouki A, Theofanidis D, Hatzitolios AI. 2017. Is management of hyperglycaemia in acute phase stroke still a dilemma? *J Endocrinol Invest* 40: 457-62
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, et al. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer research* 48: 4827-33

- Schaar KL, Brenneman MM, Savitz SI. 2010. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med* 2: 13
- Schaechter JD, Moore CI, Connell BD, Rosen BR, Dijkhuizen RM. 2006a. Structural and functional plasticity in the somatosensory cortex of chronic stroke patients. *Brain* 129: 2722-33
- Schaechter JD, Perdue KL. 2008. Enhanced cortical activation in the contralesional hemisphere of chronic stroke patients in response to motor skill challenge. *Cereb Cortex* 18: 638-47
- Schaechter JD, Stokes C, Connell BD, Perdue K, Bonmassar G. 2006b. Finger motion sensors for fMRI motor studies. *Neuroimage* 31: 1549-59
- Scheibe F, Klein O, Klose J, Priller J. 2012. Mesenchymal stromal cells rescue cortical neurons from apoptotic cell death in an in vitro model of cerebral ischemia. *Cell Mol Neurobiol* 32: 567-76
- Schellinger PD, Fiebich JB, Jansen O, Ringleb PA, Mohr A, et al. 2001. Stroke magnetic resonance imaging within 6 hours after onset of hyperacute cerebral ischemia. *Ann Neurol* 49: 460-9
- Schuh CM, Monforte X, Hackethal J, Redl H, Teuschl AH. 2016. Covalent binding of placental derived proteins to silk fibroin improves schwann cell adhesion and proliferation. *J Mater Sci Mater Med* 27: 188
- Schwarz M, Block F, Topper R, Sontag KH, Noth J. 1992. Abnormalities of somatosensory evoked potentials in the quinolinic acid model of Huntington's disease: evidence that basal ganglia modulate sensory cortical input. *Ann Neurol* 32: 358-64
- Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, et al. 2010. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 7: 11-4
- Sengupta S, Park SH, Seok GE, Patel A, Numata K, et al. 2010. Quantifying osteogenic cell degradation of silk biomaterials. *Biomacromolecules* 11: 3592-9
- Shangkai C, Naohide T, Koji Y, Yasuji H, Masaaki N, et al. 2007. Transplantation of allogeneic chondrocytes cultured in fibroin sponge and stirring chamber to promote cartilage regeneration. *Tissue Eng* 13: 483-92
- Shanina EV, Schallert T, Witte OW, Redecker C. 2006. Behavioral recovery from unilateral photothrombotic infarcts of the forelimb sensorimotor cortex in rats: role of the contralateral cortex. *Neuroscience* 139: 1495-506
- Shinozaki Y, Hosomi N, Matsumoto M. 2016. [Epidemiology of the stroke due to diabetes mellitus]. *Nihon Rinsho* 74 Suppl 2: 272-7
- Shinozuka K, Dailey T, Tajiri N, Ishikawa H, Kaneko Y, Borlongan CV. 2013. Stem cell transplantation for neuroprotection in stroke. *Brain Sci* 3: 239-61
- Shiromoto T, Okabe N, Lu F, Maruyama-Nakamura E, Himi N, et al. 2017. The Role of Endogenous Neurogenesis in Functional Recovery and Motor Map Reorganization Induced by Rehabilitative Therapy after Stroke in Rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 26: 260-72
- Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Su CY, Li H. 2006. Intracerebral peripheral blood stem cell (CD34+) implantation induces neuroplasticity by enhancing beta1 integrin-mediated angiogenesis in chronic stroke rats. *J Neurosci* 26: 3444-53
- Silva NA, Cooke MJ, Tam RY, Sousa N, Salgado AJ, et al. 2012. The effects of peptide modified gellan gum and olfactory ensheathing glia cells on neural stem/progenitor cell fate. *Biomaterials* 33: 6345-54
- Silva NA, Moreira J, Ribeiro-Samy S, Gomes ED, Tam RY, et al. 2013. Modulation of bone marrow mesenchymal stem cell secretome by ECM-like hydrogels. *Biochimie* 95: 2314-9
- Simoes EL, Bramati I, Rodrigues E, Franzoi A, Moll J, et al. 2012. Functional expansion of sensorimotor representation and structural reorganization of callosal connections in lower limb amputees. *J Neurosci* 32: 3211-20
- Sims JR, Lee SW, Topalkara K, Qiu J, Xu J, et al. 2009. Sonic hedgehog regulates ischemia/hypoxia-induced neural progenitor proliferation. *Stroke* 40: 3618-26

- Sippy T, Lapray D, Crochet S, Petersen CC. 2015. Cell-Type-Specific Sensorimotor Processing in Striatal Projection Neurons during Goal-Directed Behavior. *Neuron* 88: 298-305
- Skop NB, Calderon F, Cho CH, Gandhi CD, Levison SW. 2014. Improvements in biomaterial matrices for neural precursor cell transplantation. *Mol Cell Ther* 2: 19
- Sloan TB, Heyer EJ. 2002. Anesthesia for intraoperative neurophysiologic monitoring of the spinal cord. *J Clin Neurophysiol* 19: 430-43
- Sloane JA, Batt C, Ma Y, Harris ZM, Trapp B, Vartanian T. 2010. Hyaluronan blocks oligodendrocyte progenitor maturation and remyelination through TLR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11555-60
- Smajlovic D. 2015. Strokes in young adults: epidemiology and prevention. *Vasc Health Risk Manag* 11: 157-64
- Snider SR, Fahn S, Isgreen WP, Cote LJ. 1976. Primary sensory symptoms in parkinsonism. *Neurology* 26: 423-9
- Soffer L, Wang X, Zhang X, Kluge J, Dorfmann L, et al. 2008. Silk-based electrospun tubular scaffolds for tissue-engineered vascular grafts. *J Biomater Sci Polym Ed* 19: 653-64
- Sofia S, McCarthy MB, Gronowicz G, Kaplan DL. 2001. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res* 54: 139-48
- Solter D. 2006. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet* 7: 319-27
- Sommer CJ. 2017. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133: 245-61
- Song M, Mohamad O, Gu X, Wei L, Yu SP. 2013. Restoration of intracortical and thalamocortical circuits after transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells into the ischemic brain of mice. *Cell Transplant* 22: 2001-15
- Sozmen EG, Hinman JD, Carmichael ST. 2012. Models that matter: white matter stroke models. *Neurotherapeutics* 9: 349-58
- Sridharan R, Plath K. 2011. Small RNAs loom large during reprogramming. *Cell Stem Cell* 8: 599-601
- Steinbeck JA, Studer L. 2015. Moving stem cells to the clinic: potential and limitations for brain repair. *Neuron* 86: 187-206
- Steinberg GK, Kondziolka D, Bates D. 2016a. Response by Steinberg et al to Letter Regarding Article, "Clinical Outcomes of Transplanted Modified Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Stroke: A Phase 1/2A Study". *Stroke* 47: e269
- Steinberg GK, Kondziolka D, Wechsler LR, Lunsford LD, Coburn ML, et al. 2016b. Clinical Outcomes of Transplanted Modified Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Stroke: A Phase 1/2a Study. *Stroke* 47: 1817-24
- Stripecke R, Carmen Villacres M, Skelton D, Satake N, Halene S, Kohn D. 1999. Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy. *Gene Ther* 6: 1305-12
- Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. 1993. Acute increase in expression of growth associated protein GAP-43 following cortical ischemia in rat. *Neurosci Lett* 162: 51-4
- Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. 1995. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke* 26: 2135-44
- Stryker MP, Jenkins WM, Merzenich MM. 1987. Anesthetic state does not affect the map of the hand representation within area 3b somatosensory cortex in owl monkey. *J Comp Neurol* 258: 297-303
- Suarez-Monteagudo C, Hernandez-Ramirez P, Alvarez-Gonzalez L, Garcia-Maeso I, de la Cuetara-Bernal K, et al. 2009. Autologous bone marrow stem cell neurotransplantation in stroke patients. An open study. *Restor Neurol Neurosci* 27: 151-61
- Suh JK, Matthew HW. 2000. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 21: 2589-98

- Sun J, Wei ZZ, Gu X, Zhang JY, Zhang Y, et al. 2015a. Intranasal delivery of hypoxia-preconditioned bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhanced regenerative effects after intracerebral hemorrhagic stroke in mice. *Exp Neurol* 272: 78-87
- Sun W, Incitti T, Migliaresi C, Quattrone A, Casarosa S, Motta A. 2015b. Viability and neuronal differentiation of neural stem cells encapsulated in silk fibroin hydrogel functionalized with an IKVAV peptide. *J Tissue Eng Regen Med*
- Sun W, Motta A, Shi Y, Seekamp A, Schmidt H, et al. 2016. Co-culture of outgrowth endothelial cells with human mesenchymal stem cells in silk fibroin hydrogels promotes angiogenesis. *Biomed Mater* 11: 035009
- Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, et al. 2003. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* 111: 1843-51
- Swadlow HA. 1990. Efferent neurons and suspected interneurons in S-1 forelimb representation of the awake rabbit: receptive fields and axonal properties. *J Neurophysiol* 63: 1477-98
- Sweetnam DA, Brown CE. 2013. Stroke induces long-lasting deficits in the temporal fidelity of sensory processing in the somatosensory cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 33: 91-6
- Szybala C, Pritchard EM, Lusardi TA, Li T, Wilz A, et al. 2009. Antiepileptic effects of silk-polymer based adenosine release in kindled rats. *Exp Neurol* 219: 126-35
- Taguchi A, Sakai C, Soma T, Kasahara Y, Stern DM, et al. 2015. Intravenous Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation for Stroke: Phase1/2a Clinical Trial in a Homogeneous Group of Stroke Patients. *Stem Cells Dev* 24: 2207-18
- Taguchi A, Soma T, Tanaka H, Kanda T, Nishimura H, et al. 2004. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 114: 330-8
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-76
- Takatsuru Y, Fukumoto D, Yoshitomo M, Nemoto T, Tsukada H, Nabekura J. 2009. Neuronal circuit remodeling in the contralateral cortical hemisphere during functional recovery from cerebral infarction. *J Neurosci* 29: 10081-6
- Tang-Schomer MD, Hu X, Tupaj M, Tien LW, Whalen M, et al. 2014a. Film-based Implants for Supporting Neuron-Electrode Integrated Interfaces for The Brain. *Adv Funct Mater* 24: 1938-48
- Tang-Schomer MD, White JD, Tien LW, Schmitt LI, Valentin TM, et al. 2014b. Bioengineered functional brain-like cortical tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 13811-6
- Tang Y, Le W. 2016. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 53: 1181-94
- Tat PA, Sumer H, Jones KL, Upton K, Verma PJ. 2010. The efficient generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult mouse adipose tissue-derived and neural stem cells. *Cell Transplant* 19: 525-36
- Tate CC, Fonck C, McGrogan M, Case CC. 2010. Human mesenchymal stromal cells and their derivative, SB623 cells, rescue neural cells via trophic support following in vitro ischemia. *Cell Transplant* 19: 973-84
- Taub E, Miller NE, Novack TA, Cook EW, 3rd, Fleming WC, et al. 1993. Technique to improve chronic motor deficit after stroke. *Arch Phys Med Rehabil* 74: 347-54
- Teasell R, Bayona NA, Bitensky J. 2005. Plasticity and reorganization of the brain post stroke. *Top Stroke Rehabil* 12: 11-26
- Tennant KA, Adkins DL, Donlan NA, Asay AL, Thomas N, et al. 2011. The organization of the forelimb representation of the C57BL/6 mouse motor cortex as defined by intracortical microstimulation and cytoarchitecture. *Cereb Cortex* 21: 865-76

- Tennant KA, Kerr AL, Adkins DL, Donlan N, Thomas N, et al. 2015. Age-dependent reorganization of peri-infarct "premotor" cortex with task-specific rehabilitative training in mice. *Neurorehabil Neural Repair* 29: 193-202
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, et al. 2002. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416: 542-5
- Theus MH, Wei L, Cui L, Francis K, Hu X, et al. 2008. In vitro hypoxic preconditioning of embryonic stem cells as a strategy of promoting cell survival and functional benefits after transplantation into the ischemic rat brain. *Exp Neurol* 210: 656-70
- Thiyagarajan M, Fernandez JA, Lane SM, Griffin JH, Zlokovic BV. 2008. Activated protein C promotes neovascularization and neurogenesis in postischemic brain via protease-activated receptor 1. *J Neurosci* 28: 12788-97
- Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, Clift RA, Fefer A, et al. 1977. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood* 49: 511-33
- Thomas ED, Lochte HL, Jr., Lu WC, Ferrebee JW. 1957. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 257: 491-6
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, et al. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-7
- Thurber AE, Omenetto FG, Kaplan DL. 2015. In vivo bioresponses to silk proteins. *Biomaterials* 71: 145-57
- Tomomura A, Yamada H, Itagaki K, Fujimoto K, Katoh S. 2002. Rat brain expresses serum calcium-decreasing factor (caldecrin). *Neurosci Lett* 317: 17-20
- Tong DC, Yenari MA, Albers GW, O'Brien M, Marks MP, Moseley ME. 1998. Correlation of perfusion- and diffusion-weighted MRI with NIHSS score in acute (<6.5 hour) ischemic stroke. *Neurology* 50: 864-70
- Tong S, Xue L, Xu DP, Liu ZM, Du Y, Wang XK. 2016. In vitro culture of hFOB1.19 osteoblast cells on TGF-beta1-SF-CS three-dimensional scaffolds. *Mol Med Rep* 13: 181-7
- Topoluk N, Hawkins R, Tokish J, Mercuri J. 2017. Amniotic Mesenchymal Stromal Cells Exhibit Preferential Osteogenic and Chondrogenic Differentiation and Enhanced Matrix Production Compared With Adipose Mesenchymal Stromal Cells. *Am J Sports Med*: 363546517706138
- Tornero D, Tsuprykov O, Granmo M, Rodriguez C, Gronning-Hansen M, et al. 2017. Synaptic inputs from stroke-injured brain to grafted human stem cell-derived neurons activated by sensory stimuli. *Brain*
- Traversa R, Cicinelli P, Bassi A, Rossini PM, Bernardi G. 1997. Mapping of motor cortical reorganization after stroke. A brain stimulation study with focal magnetic pulses. *Stroke* 28: 110-7
- Tresco PA, Winn SR, Tan S, Jaeger CB, Greene LA, Aebischer P. 1992. Polymer-encapsulated PC12 cells: long-term survival and associated reduction in lesion-induced rotational behavior. *Cell Transplant* 1: 255-64
- Trounson A, McDonald C. 2015. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell* 17: 11-22
- Tsai CY, Woung LC, Yen JC, Tseng PC, Chiou SH, et al. 2016. Thermosensitive chitosan-based hydrogels for sustained release of ferulic acid on corneal wound healing. *Carbohydr Polym* 135: 308-15
- Tseng J, Mortensen RF. 1989. The effect of human C-reactive protein on the cell-attachment activity of fibronectin and laminin. *Exp Cell Res* 180: 303-13
- Tsytsarev V, Liao LD, Kong KV, Liu YH, Erzurumlu RS, et al. 2014. Recent progress in voltage-sensitive dye imaging for neuroscience. *J Nanosci Nanotechnol* 14: 4733-44

- Tu TC, Nagano M, Yamashita T, Hamada H, Ohneda K, et al. 2016. A Chemokine Receptor, CXCR4, Which Is Regulated by Hypoxia-Inducible Factor 2alpha, Is Crucial for Functional Endothelial Progenitor Cells Migration to Ischemic Tissue and Wound Repair. *Stem Cells Dev* 25: 266-76
- Tysseling-Mattiace VM, Sahni V, Niece KL, Birch D, Czeisler C, et al. 2008. Self-assembling nanofibers inhibit glial scar formation and promote axon elongation after spinal cord injury. *J Neurosci* 28: 3814-23
- Uebersax L, Apfel T, Nuss KM, Vogt R, Kim HY, et al. 2013. Biocompatibility and osteoconduction of macroporous silk fibroin implants in cortical defects in sheep. *Eur J Pharm Biopharm* 85: 107-18
- Uebersax L, Merkle HP, Meinel L. 2008. Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Control Release* 127: 12-21
- Uemura M, Refaat MM, Shinoyama M, Hayashi H, Hashimoto N, Takahashi J. 2010. Matrigel supports survival and neuronal differentiation of grafted embryonic stem cell-derived neural precursor cells. *J Neurosci Res* 88: 542-51
- Unal Cevik I, Dalkara T. 2003. Intravenously administered propidium iodide labels necrotic cells in the intact mouse brain after injury. *Cell death and differentiation* 10: 928-9
- Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R. 1988. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg* 23: 3-9
- Valeriani M, Truini A, Le Pera D, Insola A, Galeotti F, et al. 2009. Laser evoked potential recording from intracerebral deep electrodes. *Clin Neurophysiol* 120: 790-5
- van der Flier A, Sonnenberg A. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305: 285-98
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415: 1030-4
- van Velthoven CT, Kavelaars A, van Bel F, Heijnen CJ. 2010. Repeated mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxia-ischemia has distinct effects on formation and maturation of new neurons and oligodendrocytes leading to restoration of damage, corticospinal motor tract activity, and sensorimotor function. *J Neurosci* 30: 9603-11
- van Velthoven CT, Sheldon RA, Kavelaars A, Derugin N, Vexler ZS, et al. 2013. Mesenchymal stem cell transplantation attenuates brain injury after neonatal stroke. *Stroke* 44: 1426-32
- van Velthoven CT, van de Looij Y, Kavelaars A, Zijlstra J, van Bel F, et al. 2012. Mesenchymal stem cells restore cortical rewiring after neonatal ischemia in mice. *Ann Neurol* 71: 785-96
- Varkey A, Venugopal E, Sugumaran P, Janarthanan G, Pillai MM, et al. 2015. Impact of silk fibroin-based scaffold structures on human osteoblast MG63 cell attachment and proliferation. *Int J Nanomedicine* 10 Suppl 1: 43-51
- Venna VR, Xu Y, Doran SJ, Patrizz A, McCullough LD. 2014. Social interaction plays a critical role in neurogenesis and recovery after stroke. *Transl Psychiatry* 4: e351
- Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP, Jr. 1985. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 559-77
- Vorobyov VV, Schibaev NV, Morelli M, Carta AR. 2003. EEG modifications in the cortex and striatum after dopaminergic priming in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 972: 177-85
- Vu Q, Xie K, Eckert M, Zhao W, Cramer SC. 2014. Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells for ischemic stroke. *Neurology* 82: 1277-86
- Wakabayashi K, Nagai A, Sheikh AM, Shiota Y, Narantuya D, et al. 2010. Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. *J Neurosci Res* 88: 1017-25

- Wang TW, Spector M. 2009. Development of hyaluronic acid-based scaffolds for brain tissue engineering. *Acta Biomater* 5: 2371-84
- Wang X, Kluge JA, Leisk GG, Kaplan DL. 2008a. Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation. *Biomaterials* 29: 1054-64
- Wang X, Liu Y, Sun Y, Liu W, Jin X. 2016a. Blood brain barrier breakdown was found in non-infarcted area after 2-h MCAO. *J Neurol Sci* 363: 63-8
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, et al. 2003. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422: 897-901
- Wang Y, Cooke MJ, Morshead CM, Shoichet MS. 2012. Hydrogel delivery of erythropoietin to the brain for endogenous stem cell stimulation after stroke injury. *Biomaterials* 33: 2681-92
- Wang Y, Kim HJ, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. 2006. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials* 27: 6064-82
- Wang Y, Rudym DD, Walsh A, Abrahamsen L, Kim HJ, et al. 2008b. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials* 29: 3415-28
- Wang Y, Zhao Z, Chow N, Rajput PS, Griffin JH, et al. 2013. Activated protein C analog protects from ischemic stroke and extends the therapeutic window of tissue-type plasminogen activator in aged female mice and hypertensive rats. *Stroke* 44: 3529-36
- Wang Y, Zhao Z, Rege SV, Wang M, Si G, et al. 2016b. 3K3A-activated protein C stimulates postischemic neuronal repair by human neural stem cells in mice. *Nat Med* 22: 1050-5
- Wang YC, Sanchez-Mendoza EH, Doepfner TR, Hermann DM. 2017. Post-acute delivery of memantine promotes post-ischemic neurological recovery, peri-infarct tissue remodeling, and contralesional brain plasticity. *J Cereb Blood Flow Metab* 37: 980-93
- Ward NS, Brown MM, Thompson AJ, Frackowiak RS. 2003. Neural correlates of outcome after stroke: a cross-sectional fMRI study. *Brain* 126: 1430-48
- Warren L, Ni Y, Wang J, Guo X. 2012. Feeder-free derivation of human induced pluripotent stem cells with messenger RNA. *Sci Rep* 2: 657
- Weaver M, Leshley K, Sands H, Gritman KR, Legos JJ, Tuma RF. 2002. LEX032, a novel recombinant serpin, protects the brain after transient focal ischemia. *Microvasc Res* 63: 327-34
- Weber R, Ramos-Cabrer P, Justicia C, Wiedermann D, Strecker C, et al. 2008. Early prediction of functional recovery after experimental stroke: functional magnetic resonance imaging, electrophysiology, and behavioral testing in rats. *J Neurosci* 28: 1022-9
- Wei L, Cui L, Snider BJ, Rivkin M, Yu SS, et al. 2005. Transplantation of embryonic stem cells overexpressing Bcl-2 promotes functional recovery after transient cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 19: 183-93
- Wei N, Yu SP, Gu X, Taylor TM, Song D, et al. 2013. Delayed intranasal delivery of hypoxic-preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhanced cell homing and therapeutic benefits after ischemic stroke in mice. *Cell Transplant* 22: 977-91
- Wei Z, Chen XC, Song Y, Pan XD, Dai XM, et al. 2016. Amyloid beta Protein Aggravates Neuronal Senescence and Cognitive Deficits in 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Chinese medical journal* 129: 1835-44
- Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. 2003. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 121: 368-74
- Whishaw IQ. 2000. Loss of the innate cortical engram for action patterns used in skilled reaching and the development of behavioral compensation following motor cortex lesions in the rat. *Neuropharmacology* 39: 788-805
- Widhe M, Shalaly ND, Hedhammar M. 2016. A fibronectin mimetic motif improves integrin mediated cell binding to recombinant spider silk matrices. *Biomaterials* 74: 256-66
- Winship IR, Murphy TH. 2008. In vivo calcium imaging reveals functional rewiring of single somatosensory neurons after stroke. *J Neurosci* 28: 6592-606

- Witte OW, Bidmon HJ, Schiene K, Redecker C, Hagemann G. 2000. Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 1149-65
- Wittmer CR, Claudepierre T, Reber M, Wiedemann P, Garlick JA, et al. 2011. Multifunctionalized electrospun silk fibers promote axon regeneration in central nervous system. *Adv Funct Mater* 21: 4202
- Wityk RJ, Beauchamp NJ, Jr. 2000. Diagnostic evaluation of stroke. *Neurol Clin* 18: 357-78
- Woerly S, Laroche G, Marchand R, Pato J, Subr V, Ulbrich K. 1995. Intracerebral implantation of hydrogel-coupled adhesion peptides: tissue reaction. *J Neural Transplant Plast* 5: 245-55
- Woerly S, Marchand R, Lavalley C. 1990. Intracerebral implantation of synthetic polymer/biopolymer matrix: a new perspective for brain repair. *Biomaterials* 11: 97-107
- Wohlrab S, Muller S, Schmidt A, Neubauer S, Kessler H, et al. 2012. Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins. *Biomaterials* 33: 6650-9
- Woitzik J, Hecht N, Pinczolis A, Sandow N, Major S, et al. 2013. Propagation of cortical spreading depolarization in the human cortex after malignant stroke. *Neurology* 80: 1095-102
- Wree A, Itzev DE, Schmitt O, Usunoff KG. 2005. Neurons in the dorsal column nuclei of the rat emit a moderate projection to the ipsilateral ventrobasal thalamus. *Anat Embryol (Berl)* 210: 155-62
- Wright BJ, Jackson MB. 2015. Voltage Imaging in the Study of Hippocampal Circuit Function and Plasticity. *Adv Exp Med Biol* 859: 197-211
- Wu CM, McLaughlin K, Lorenzetti DL, Hill MD, Manns BJ, Ghali WA. 2007. Early risk of stroke after transient ischemic attack: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 167: 2417-22
- Wu M, Guo X, Yang L, Wang Y, Tang Y, et al. 2014. Mesenchymal stem cells with modification of junctional adhesion molecule a induce hair formation. *Stem Cells Transl Med* 3: 481-8
- Wu M, Ji S, Xiao S, Kong Z, Fang H, et al. 2015a. JAM-A promotes wound healing by enhancing both homing and secretory activities of mesenchymal stem cells. *Clin Sci (Lond)* 129: 575-88
- Wu Y, Wu J, Ju R, Chen Z, Xu Q. 2015b. Comparison of intracerebral transplantation effects of different stem cells on rodent stroke models. *Cell Biochem Funct* 33: 174-82
- Xerri C, Merzenich MM, Peterson BE, Jenkins W. 1998. Plasticity of primary somatosensory cortex paralleling sensorimotor skill recovery from stroke in adult monkeys. *J Neurophysiol* 79: 2119-48
- Xin H, Li Y, Liu Z, Wang X, Shang X, et al. 2013. MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles. *Stem Cells* 31: 2737-46
- Xu Y, Zhang Z, Chen X, Li R, Li D, Feng S. 2016. A Silk Fibroin/Collagen Nerve Scaffold Seeded with a Co-Culture of Schwann Cells and Adipose-Derived Stem Cells for Sciatic Nerve Regeneration. *PLoS One* 11: e0147184
- Yagami T, Takahara Y, Ishibashi C, Sakaguchi G, Itoh N, et al. 2004. Amyloid beta protein impairs motor function via thromboxane A2 in the rat striatum. *Neurobiol Dis* 16: 481-9
- Yamada H, Igarashi Y, Takasu Y, Saito H, Tsubouchi K. 2004. Identification of fibroin-derived peptides enhancing the proliferation of cultured human skin fibroblasts. *Biomaterials* 25: 467-72
- Yan G, Xuan Y, Dai Z, Zhang G, Xu H, et al. 2015. Evolution of blood-brain barrier damage associated with changes in brain metabolites following acute ischemia. *Neuroreport* 26: 945-51
- Yanagisawa D, Qi M, Kim DH, Kitamura Y, Inden M, et al. 2006. Improvement of focal ischemia-induced rat dopaminergic dysfunction by striatal transplantation of mouse embryonic stem cells. *Neurosci Lett* 407: 74-9

- Yang CY, Song B, Ao Y, Nowak AP, Abelowitz RB, et al. 2009a. Biocompatibility of amphiphilic diblock copolypeptide hydrogels in the central nervous system. *Biomaterials* 30: 2881-98
- Yang L, Yaseen M, Zhao X, Coffey P, Pan F, et al. 2015. Gelatin modified ultrathin silk fibroin films for enhanced proliferation of cells. *Biomed Mater* 10: 025003
- Yang M, Wei X, Li J, Heine LA, Rosenwasser R, Iacovitti L. 2010. Changes in host blood factors and brain glia accompanying the functional recovery after systemic administration of bone marrow stem cells in ischemic stroke rats. *Cell Transplant* 19: 1073-84
- Yang MC, Wang SS, Chou NK, Chi NH, Huang YY, et al. 2009b. The cardiomyogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells on silk fibroin-polysaccharide cardiac patches in vitro. *Biomaterials* 30: 3757-65
- Yang Q, Teng BH, Wang LN, Li K, Xu C, et al. 2017. Silk fibroin/cartilage extracellular matrix scaffolds with sequential delivery of TGF-beta3 for chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *Int J Nanomedicine* 12: 6721-33
- Yannas IV, Burke JF. 1980. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res* 14: 65-81
- Yano A, Onozuka A, Matin K, Imai S, Hanada N, Nisizawa T. 2003. RGD motif enhances immunogenicity and adjuvanicity of peptide antigens following intranasal immunization. *Vaccine* 22: 237-43
- Yelnik J, Francois C, Percheron G. 1997. Spatial relationships between striatal axonal endings and pallidal neurons in macaque monkeys. *Adv Neurol* 74: 45-56
- Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. 2002. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416: 545-8
- Yonemura N, Mita K, Tamura T, Sehnael F. 2009. Conservation of silk genes in Trichoptera and Lepidoptera. *J Mol Evol* 68: 641-53
- Yonemura N, Sehnael F, Konik P, Ajimura M, Tamura T, Mita K. 2012. Conservation of a pair of serpin 2 genes and their expression in Amphiesmenoptera. *Insect Biochem Mol Biol* 42: 371-80
- Yu H, Cao B, Feng M, Zhou Q, Sun X, et al. 2010. Combined transplantation of neural stem cells and collagen type I promote functional recovery after cerebral ischemia in rats. *Anatomical record* 293: 911-7
- Yuan T, Liao W, Feng NH, Lou YL, Niu X, et al. 2013. Human induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells survive, migrate, differentiate, and improve neurologic function in a rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stem Cell Res Ther* 4: 73
- Zakiewicz IM, Bjaalie JG, Leergaard TB. 2014. Brain-wide map of efferent projections from rat barrel cortex. *Frontiers in neuroinformatics* 8: 5
- Zandieh S, Hopf R, Redl H, Schlag MG. 2003. The effect of ketamine/xylazine anesthesia on sensory and motor evoked potentials in the rat. *Spinal Cord* 41: 16-22
- Zanier ER, Pischiutta F, Riganti L, Marchesi F, Turola E, et al. 2014. Bone marrow mesenchymal stromal cells drive protective M2 microglia polarization after brain trauma. *Neurotherapeutics* 11: 679-95
- Zhang H, Prabhakar P, Sealock R, Faber JE. 2010. Wide genetic variation in the native pial collateral circulation is a major determinant of variation in severity of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 923-34
- Zhang J, Huang X, Wang H, Liu X, Zhang T, et al. 2015a. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. *Stem Cell Res Ther* 6: 234
- Zhang L, Yang X, Yue Y, Ye J, Yao Y, et al. 2015b. Cyclic mechanical stress modulates neurotrophic and myelinating gene expression of Schwann cells. *Cell Prolif* 48: 59-66
- Zhang S, Burda JE, Anderson MA, Zhao Z, Ao Y, et al. 2015c. Thermoresponsive Copolypeptide Hydrogel Vehicles for Central Nervous System Cell Delivery. *ACS Biomater Sci Eng* 1: 705-17

- Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA. 2001. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19: 1129-33
- Zhang Y, Chopp M, Liu XS, Katakowski M, Wang X, et al. 2017. Exosomes Derived from Mesenchymal Stromal Cells Promote Axonal Growth of Cortical Neurons. *Mol Neurobiol* 54: 2659-73
- Zhao BQ, Wang S, Kim HY, Storrie H, Rosen BR, et al. 2006. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med* 12: 441-5
- Zhao G, Cui J, Qin Q, Zhang J, Liu L, et al. 2010. Mechanical stiffness of liver tissues in relation to integrin beta1 expression may influence the development of hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol* 102: 482-9
- Zhao Q, Hu J, Xiang J, Gu Y, Jin P, et al. 2015. Intranasal administration of human umbilical cord mesenchymal stem cells-conditioned medium enhances vascular remodeling after stroke. *Brain Res* 1624: 489-96
- Zhaorigetu S, Yanaka N, Sasaki M, Watanabe H, Kato N. 2003. Silk protein, sericin, suppresses DMBA-TPA-induced mouse skin tumorigenesis by reducing oxidative stress, inflammatory responses and endogenous tumor promoter TNF-alpha. *Oncol Rep* 10: 537-43
- Zhong J, Chan A, Morad L, Kornblum HI, Fan G, Carmichael ST. 2010. Hydrogel matrix to support stem cell survival after brain transplantation in stroke. *Neurorehabil Neural Repair* 24: 636-44
- Zhou CZ, Confalonieri F, Jacquet M, Perasso R, Li ZG, Janin J. 2001. Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins* 44: 119-22
- Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, et al. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4: 381-4
- Zhou T, Benda C, Dunzinger S, Huang Y, Ho JC, et al. 2012. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat Protoc* 7: 2080-9
- Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, Li H, Wang XY, et al. 2010. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat Protoc* 5: 550-60
- Zhu JM, Zhao YY, Chen SD, Zhang WH, Lou L, Jin X. 2011. Functional recovery after transplantation of neural stem cells modified by brain-derived neurotrophic factor in rats with cerebral ischaemia. *J Int Med Res* 39: 488-98
- Zhu Y, Guan YM, Huang HL, Wang QS. 2014. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation suppresses inflammatory responses and neuronal apoptosis during early stage of focal cerebral ischemia in rabbits. *Acta Pharmacol Sin* 35: 585-91
- Ziai WC, Tuhim S, Lane K, McBee N, Lees K, et al. 2014. A multicenter, randomized, double-blinded, placebo-controlled phase III study of Clot Lysis Evaluation of Accelerated Resolution of Intraventricular Hemorrhage (CLEAR III). *Int J Stroke* 9: 536-42
- Zurita E, Chagoyen M, Cantero M, Alonso R, Gonzalez-Neira A, et al. 2011. Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Res* 20: 481-9
- Zwemer CF, Song MY, Carello KA, D'Alecy LG. 2007. Strain differences in response to acute hypoxia: CD-1 versus C57BL/6J mice. *J Appl Physiol (1985)* 102: 286-93

VIII. ANEXO

Full length article

Safety and tolerability of silk fibroin hydrogels implanted into the mouse brain

Laura Fernández-García^a, Núria Marí-Buyé^{a,c}, Juan A. Barrios^a, Rodrigo Madurga^{a,c}, Manuel Elices^{a,c}, José Pérez-Rigueiro^{a,c}, Milagros Ramos^{a,b}, Gustavo V. Guinea^{a,c}, Daniel González-Nieto^{a,b,*}

^a Center for Biomedical Technology, Universidad Politécnica, Madrid, Spain

^b Biomedical Research Networking Center in Bioengineering Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Madrid, Spain

^c Departamento de Ciencia de Materiales, ETSI Caminos, Canales y Puertos, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 May 2016

Received in revised form 24 July 2016

Accepted 1 September 2016

Available online 2 September 2016

Keywords:

Silk fibroin

Hydrogels

Brain tissue

Biocompatibility

Neurophysiological evaluation

ABSTRACT

At present, effective therapies to repair the central nervous system do not exist. Biomaterials might represent a new frontier for the development of neurorestorative therapies after brain injury and degeneration. In this study, an *in situ* gelling silk fibroin hydrogel was developed via the sonication-induced gelation of regenerated silk fibroin solutions. An adequate timeframe for the integration of the biomaterial into the brain tissue was obtained by controlling the intensity and time of sonication. After the intrastriatal injection of silk fibroin the inflammation and cell death in the implantation area were transient. We did not detect considerable cognitive or sensorimotor deficits, either as examined by different behavioral tests or an electrophysiological analysis. The sleep and wakefulness states studied by chronic electroencephalogram recordings and the fitness of thalamocortical projections and the somatosensory cortex explored by evoked potentials were in the range of normality. The methodology used in this study might serve to assess the biological safety of other biomaterials implanted into the rodent brain. Our study highlights the biocompatibility of native silk with brain tissue and extends the current dogma of the innocuousness of this biomaterial for therapeutic applications, which has repercussion in regenerative neuroscience.

Statement of Significance

The increasingly use of sophisticated biomaterials to encapsulate stem cells has changed the comprehensive overview of potential strategies for repairing the nervous system. Silk fibroin (SF) meets with most of the standards of a biomaterial suitable to enhance stem cell survival and function. However, a proof-of-principle of the *in vivo* safety and tolerability of SF implanted into the brain tissue is needed. In this study we have examined the tissue bioresponse and brain function after implantation of SF hydrogels. We have demonstrated the benign coexistence of silk with the complex neuronal circuitry that governs sensorimotor coordination and mechanisms such as learning and memory. Our results have repercussion in the development of advances strategies using this biomaterial in regenerative neuroscience.

© 2016 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In the field of regenerative engineering, the use of different biomaterials has introduced a new approach to exploit opportunities in the treatment of different human disorders in which cell death and/or degeneration constitute a common factor [1,2]. For

example, the development of different biomaterials to support the function and assembly of different types of stem cells and progenitors has made substantial progress in cardiac tissue engineering [3]. When combined with cells, biomaterials should create an adequate microenvironment that can support the growth, retention and function of engrafted cells as well as the production of extracellular matrix components and other soluble factors that ensure the functional integration of the graft in the host tissue.

Brain damage by mechanical trauma or ischemic stroke and several degenerative disorders, such as Alzheimer's, Huntington's or Parkinson's disease, represent the main causes of neurological

* Corresponding author at: Experimental Neurology Laboratory, Center for Biomedical Technology, Universidad Politécnica de Madrid, Campus de Montegancedo S/N, Pozuelo de Alarcón, 28223 Madrid, Spain.

E-mail address: daniel.gonzalez@ctb.upm.es (D. González-Nieto).

dysfunction in humans. Effective therapies to promote substantial recovery after brain injury are currently not available. Transcranial stimulation, optogenetics, low light laser therapy, stereotactic radiotherapy and magnetic resonance-guided focused ultrasound represent a relatively recent group of technologies for therapeutic opportunities in this field. Very recently, enhancing plasticity at the brain and spinal cord levels using antibodies against neurite-growth-inhibitory protein (Nogo-A) has been associated with improved functional recovery [4]. Another group of strategies is based in the use of stem cells encapsulated in different biomaterials, such as matrigel [5], PLGA [6], alginate [7], collagen [8] or hyaluronic acid [9], which have been demonstrated to improve functional recovery in rodents after brain injury.

The invasiveness of intra-cerebral stem cell transplantation with distinct biomaterials and their increasingly widespread use in preclinical models raises questions with respect to the use of these strategies in patients. However, this approach provides a more direct route for cell-to-cell interactions and the exact location of the implant in the brain parenchyma to support the trophic effects associated with stem cell function. Using adequate materials that can produce minor adverse effects compared with the dysfunction caused by the disease itself may compensate for the aggressive character of this procedure and justify this type of therapy, especially in patients with more severe neurological deficits.

Silk fibroin (SF) meets with most of the standards of a biomaterial suitable for the above-mentioned applications. Compared with other biomaterials, such as collagen or polylactic acid, silk induces a lower inflammatory response [10]. SF has been used in a variety of biomedical applications [2,11] and in different formats; specifically, it has been widely employed as medical sutures, for bone and cartilage tissue engineering [12,13] or recently in clinical trials for the reconstruction of the tympanic membrane and breast implants [14,15]. Although this biomaterial has never been used in preclinical models of brain repair, SF composites have been employed as anti-epileptic drug carriers [16] and in the regeneration of peripheral nerves in rats as nanoparticles or in fibrillar structures [17,18]. Due to the emerging potential of SF for brain therapeutic opportunities and to the possibility for getting SF in the format of hydrogel [19], we examined the feasibility of the *in situ* gel formation induced by ultrasound sonication [20] and the short and long-term biocompatibility of this biomaterial within the mouse brain parenchyma in this study. Our results highlight the proper compatibility of this material with brain tissue. Cell death and the inflammatory responses were transient, and we did not detect sensorimotor or cognitive deficits of relevance examined by several behavioral tests and electrophysiological recordings. Our study creates a precedent for the extended use of native SF or modified forms thereof for brain transplantation in animal models as initial phases for the development of more advanced strategies in experimental brain damage and degeneration.

2. Material and methods

Other methods can be found in [Supplementary material](#) (available on the Acta Biomaterialia Web site).

2.1. Silk fibroin extraction

Silk fibroin (SF) was extracted from *Bombyx mori* cocoons, kindly provided by J. L. Cenis (IMIDA, Murcia, Spain). Cocoons were initially cut in small pieces and degummed to remove sericin in sodium carbonate solution at 0.2% (w/v) in an autoclave (121 °C, 103.4 kPa, for 30 min plus 20 min drying). After degumming, fibroin fibers were repeatedly rinsed in distilled water and allowed to dry overnight. This degumming process was shown to remove

sericin from the silk fibers below values detectable by polyacrylamide gel electrophoresis [21]. Afterwards, the dry fibers were dissolved in 9.4 M lithium bromide aqueous solution for 4 h at 60 °C under continuous stirring, as previously described [22]. The final solution was dialyzed against water for 48 h using Slide-a-Lyzer cassettes (MWCO 3.5 K, Pierce). Finally, the resulting solution was centrifuged at 5000 rpm for 20 min at 4 °C to remove impurities, frozen at –80 °C and lyophilized to obtain a final SF powder.

2.2. Sonication-induced silk fibroin hydrogels

To explore the best sonication conditions to induce SF gelation, 6 ml of SF at 1 or 2% (w/v) concentration in phosphate buffer saline (PBS) without calcium and magnesium were filtered with 0.2 µm filters and introduced in centrifuge tubes. The solutions were sonicated with a Branson 450 Sonifier coupled to a 3 mm diameter Tapered Microtip. During sonication, the sample tubes were always kept in ice water. The solutions were subjected to one pulse of 30 s or two pulses of 30 s each – with 1 min pause interval between them at room temperature – at three sonication amplitudes (20%, 40% and 60%). The gelation time point was fixed at the time the liquid no longer flow when tilting the tube.

2.3. Mechanical testing

Uniaxial unconfined compression tests were performed on SF hydrogels. After sonication, SF solution was poured into cylindrical molds of 10.4 mm diameter and allowed to gel at room temperature. After 24 h, gels were cut in approximately 10 mm height cylinders and placed between two parallel plates adapted to an Instron 4411 testing machine. The cylinders were centered with the loading axis of the testing machine. The force was measured with an electronic balance (Kern PLI 3500) placed under the lower plate and the compression speed was fixed at 1 mm/min. The compression tests were performed both in air (24 °C and 45% relative humidity) and with the gel sample immersed in PBS (24 °C). The cross-sectional areas were used to compute stress-strain curves from force-displacement. At least two samples for each condition were tested. Results were presented as (engineering) stress- (engineering) strain plots. (Engineering) stress, s , is defined as $s = F/A_0$, where F is the instantaneous force and A_0 the initial cross sectional area. (Engineering) strain, e , is defined as $e = \Delta H/H_0$, where ΔH is the decrease in height of the sample and H_0 is the initial height.

2.4. Monitoring the gelation process

To follow the gelation process, turbidity changes were monitored with an UV/Vis spectrophotometer (ELX808, BioTek). Additionally, the formation of β -sheet was followed over time by attenuated total reflectance – Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR). For this purpose, 50 µl of solution were frozen at set time-points after sonication and subsequently lyophilized and analyzed by ATR-FTIR in a Nicolet iS5 FTIR spectrometer with an ATR module. ATR-FTIR spectra were obtained in the range of 550–4000 cm^{-1} with 64 scans per spectrum with a resolution of 4 cm^{-1} .

2.5. Animals

In vivo experiments were conducted using adult male C57BL/6 mice (20–28 g body weight; eight-ten weeks old). In a set of experiments, Alzheimer's disease transgenic mice (5XFAD) co-expressing a total of five familial Alzheimer's disease mutations, three in the human amyloid precursor protein and two in the human presenilin 1 gene were used [23]. Transgenic 5XFAD mice were obtained commercially from The Jackson Laboratory (strain

name B6C3 Tg(APPswe, PSEN1dE9) 85Dbo/Mmjax). All mice were bred and housed in the animal facility of the Center for Biomedical Technology. The animals were housed with free access to food and water in an animal room with a controlled temperature and a natural light cycle. Daily routines were performed between 7 a.m. and 4 p.m. by authorized personnel. All procedures were performed under the Spanish Regulations for animal experimentation (Laws 53/2013 and ECC/566/2015) and according to the ARRIVE (Animal Research: Reporting *In Vivo* Experiments) guidelines.

2.6. Stereotaxic surgery and silk fibroin injection

The animals were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) prior to the stereotaxic injection of phosphate-buffered saline (PBS at pH = 7.4) or SF in PBS. For analgesia, 0.1 mg/kg of buprenorphin was injected subcutaneously prior to and 8 h after surgery. The mice were secured in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, California, USA) and under aseptic conditions a skin incision was made, the skull was exposed, and a burr hole was drilled. The different solutions were infused unilaterally into the caudate putamen (striatum) using a Hamilton syringe with needle (model 701SN, 31-G/Pst3, Teknokroma). The injections were performed at the following coordinates from bregma: posterior + 1 mm, laterally + 2.7 mm, and ventrally 2.3 mm. The syringe tip was lowered through the hole drilled in the skull and left in place for two minutes. The solution was then infused in a total volume of 5 μ l at a rate of 1 μ l/min. When the solution was infused, the needle was left in place for 5 min to allow the solution diffuse and gel into the striatum.

2.7. Histological procedures and immunohistochemistry

2.7.1. Silk fibroin identification *in vivo*

The animals were anesthetized with an overdose of chloral hydrate and perfused transcardially with cold PBS (pH 7.4) followed by 4% paraformaldehyde in PBS. Brains were removed, post-fixed for 48 h and cryoprotected in 30% sucrose. The brain tissue was cut into 30- μ m free-floating sections on a freezing Leitz Wetzlar microtome. Coronal sections were mounted and stained with toluidine blue according to standard procedures. Sections were digitized by a CCD camera; capture and image reconstruction was performed using NIS-elements software (Nikon Instruments, Barcelona, Spain). The quantification of silk degradation over time after injection was performed delineating and measuring (ImageJ software; NIH) the total area occupied by the implant (clearly identified after toluidine blue staining) on serial coronal sections, multiplying the areas by the section thickness (30- μ m), and summing the values for all sections. The sections were analyzed in the range of –450 to +450 μ m (antero-posterior axis) with respect the site of striatal injection (0- μ m), an interval containing the entire injected biomaterial.

2.7.2. CD45 immunohistochemistry

Coronal sections (30 μ m) were cut and free-floating immunohistochemistry for CD45 was performed to identify microglia and infiltrated leukocyte cell populations in the brain. In brief, brain sections were blocked with 5% goat serum in PBS prior overnight incubation (4 °C) with a rat anti-mouse CD45 antibody conjugated with allophycocyanin (dilution 1:50; Cat: 559864; BD Pharmingen, La Jolla, CA). Stained sections were covered with fluorescence mounting medium and samples were examined and acquired using a fluorescence microscopy (Leica DMI3000, Nussloch, Germany).

2.7.3. Dead cell identification by labeling with propidium iodide

To examine cell death 200 μ l of a solution of propidium iodide in PBS (20 mg/kg) was introduced through the retro-orbital venous sinus. Five hours later, the coronal sections were obtained as described above. Because a leaky blood-brain barrier (BBB) is required to allow the entry of propidium iodide (PI) into the brain after its intravenous injection [24], we performed a craniotomy in all the animals (PBS and SF groups), five minutes before the administration of PI to temporally increase the BBB permeability. In other set of experiments, craniotomy-induced loss of blood-brain barrier integrity was confirmed by intravenous injection of 5(6)-Carboxyfluorescein (200 μ l, 3 mM, C194 Molecular Probes) following identification of fluorescent labeling in different brain areas with respect the non-craniotomized animals (Supplementary Fig. S3C).

2.8. Flow cytometry

2.8.1. Immunophenotypic identification of reactive microglia and infiltrating inflammatory cells

The animals were perfused transcardially and the brains were rapidly removed. A piece of brain (~20 mm³) containing the striatum was dissected from the injected hemisphere and dispersed into single cell suspensions by grinding between the frosted ends of two glass slides and then pass through a cell strainer (100 μ m) in the continuous presence of cold PBS (pH = 7.4). The cells were centrifuged at 450 $\times$ g for 10 min, resuspended in 200 μ l of PBS and incubated with 0.5% anti-mouse-CD45 antibody-allophycocyanin-conjugated (Cat: 559864; BD Pharmingen) and 5% mouse serum for 25 min at 4 °C. Flow cytometry acquisition was carried out in a BD FACSCanto II system (Becton Dickinson, San Jose, CA). At least 1×10^5 events were acquired from each sample (in triplicate) on the APC channel (excitation at 633 nm and emission at 660 nm). Gating and analysis of events was accomplished with FlowJo software package (FLOWJO, LLC, Ashland, OR). Thresholds were set at ~99% of negative population for the appropriate isotype antibody control and maintained throughout the analysis. Positive and negative controls of inflammation consisted of brain samples derived from ischemic (stroke model) and naïve non-injected mice respectively. Cell acquisition was made available through the Hospital Ramón & Cajal Core Facility for Flow Cytometry (Madrid, Spain).

2.8.2. Dead cell identification

The brains were removed five hours after the intravenous injection of propidium iodide. The single-cell suspensions were processed as described above and fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min. The events were acquired on the PE channel (excitation at 488 nm and emission at 530 nm) of a BD FACSCanto II system.

2.9. Behavioral assessment

Sensorimotor evaluation was examined by the grid and cylinder tests as we previously described [25]. In the grid test we analyzed the frequencies of slips with both forepaws. The animal behaviors were videotaped and the total numbers of right and left forepaws steps during locomotion and the total number of foot faults for each forelimb were scored. In the cylinder test, twenty-five contacts were counted and recorded per trial and the paw or paws used for each contact were scored. The laterality index was calculated as {Contacts (Right) – Contacts (Left)} / {Contacts (Right) + Contacts (Left) + Contacts (Right and left)}; positive scores denote preferential use of the right (unaffected) paw and negative scores indicate preferential use of the left (affected) paw. The spontaneous alternation Y-maze task was used for assessing spatial working memory in the mice and to ascribe possible cognitive deficits.

This test was performed as described previously with minor modifications [26]. Each mouse was placed in the center of a symmetrical Y-maze and was allowed to explore freely through the maze during a 6–8 min session. The total number of arms entries and the sequence of entries were determined from video recorded sessions. The percent of alternation was calculated as the number of alternations (entries into 3 different arms consecutively) divided by the total possible alternations (the total number of arms entered minus 2) and multiplied by 100. A high alternation rate is indicative of sustained cognition indicating that the animals remember which arm was entered last to not re-enter it (typical score for normal mice was 60%). Motor learning could be also inferred from the progressive better performances in the grid test when the animals performed this test weekly. In cognitive and sensorimotor tests, blinded evaluation was examined on video recordings by L.F.-G.

2.10. Electrophysiology

2.10.1. Sleep recording and automated staging

The mice were anesthetized and the skull was exposed and four small holes were drilled over the cortex. Electroencephalogram (EEG) recordings were made using two polyimide-insulated stainless electrodes (0.2 mm diameter; PlasticsOne, Virginia, USA), which were fixed permanently into the skull in the frontal (from bregma: anterior + 0.5 mm; laterally + 2.0 mm; ventrally + 1.0 mm) and parietal (from bregma: posterior + 2.0 mm; laterally + 1.5 mm; ventrally + 1.0 mm) bones of the injected hemisphere. Two screws placed over the occipital cortex of the non-injected hemisphere and lambda served as the ground and reference electrodes. A third screw was inserted and fixed (glued) in the cervical musculature for electromyogram (EMG) recordings of postural tone. The electrodes, soldered to gold socket contacts (Plastics One, Roanoke, VA), were pushed into a 6-pin plug (363 plug, Plastics One), which was then connected to a fully rotating commutator (SLC6, Plastics One). One week after surgery, the animals were first habituated in individual recording chambers for 48 h at 22 °C and light/dark cycle conditions. The EEG and EMG signals were amplified by a Grass Model 78D polygraph; band-pass filtered (0.5–100 Hz for EEG and 20–100 Hz for EMG) using a programmable signal conditioner (CyberAmp 380, Axon Instruments) and continuously sampled at 500 Hz using Labview software. Sleep/wake stages were scored offline as wakefulness, non-rapid eye movement (NREM) sleep and rapid eye movement (REM) sleep in 5 s epochs using a semi-automated approach. The caudal electrode was placed in the lateral parietal cortex, overlaying the dorsal hippocampus, allowing reliable recordings of theta oscillation characteristic of NREM sleep and exploratory behavior. The rostral electrode was placed over the frontal cortex to capture EEG slow waves characteristic of NREM sleep. The sleep scoring procedure consisted of an initial automated step using custom software based on matlab scripts, followed by a review of all epochs by an experienced sleep scorer (J. A. B.). Through Fourier analysis on 5-s epochs of the raw EEG signals, spectral power was calculated for three frequency bands: delta (0.5–4.0 Hz), sigma (10–14 Hz) and theta (6–9 Hz), and power of EMG signal. Staging of behavioral states was determined based on three variables: (1) the product of sigma density and theta density (sigma*theta), (2) delta divided by theta (delta/theta), and (3) the EMG amplitude. High EMG and low sigma*theta is characteristic of waking, while low EMG and high sigma*theta is related with sleep. High and low delta/theta is typical of NREM and REM sleep respectively. Total wake and sleep for the recording period was determined by the addition of all wake, NREM and REM epochs. For each 5-s staged epoch, spectral power density was also calculated using Welch's method.

2.10.2. Somatosensory evoked potentials recordings

Somatosensory evoked potentials (SSEPs) were recorded as we previously described [25]. Two electrodes (0.2 mm diameter) were implanted in the right (injected) and left (non-injected) hemispheres (from bregma: anterior + 0.5 mm, laterally $\pm$ 2.0 mm, depth 0.5 mm). Two screws were placed over the visual cortex of both hemispheres and served as the indifferent and ground electrodes (from bregma: posterior + 3 mm, laterally $\pm$ 2.0 mm). Recordings were obtained from both hemispheres after ipsi- and contra-lateral forelimb stimulation. Signals were amplified ($\times 10^3$) and filtered (band-pass, 10–2,000 Hz) using a portable electromyography (EMG)-evoked potentials (EP) device (Micromed, Mogliano Veneto, Treviso, Italy).

2.11. Statistical analysis

The R package and SigmaPlot (Systat, Germany) were used for the statistical analyses. All values are expressed as mean $\pm$ the standard error of the mean (S.E.M.). To examine significant differences in the volume of SF deposits over time after injection, we performed a one-way analysis of variance (ANOVA) test. After SF implantation, the temporal course of inflammation, cell death, sensorimotor and cognitive function (behavioral tests) was analyzed using a two-way ANOVA, followed in case of significant differences by Tukey's post hoc test. When applicable, statistical significance was assessed by Student *t*-test for independent samples. Components of sleep structure were analyzed for differences between treatments using factorial ANOVA, and when applicable, the Tukey post hoc tests were applied. Sleep state comparisons within mice groups were performed using repeated-measures ANOVA, with Scheffe's *F*-test when applicable. Statistical significance was achieved for probabilities of the null hypothesis at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Design and development of an injectable system based on silk fibroin hydrogels

We first studied the time required for SF solutions to gel after sonication. To allow the injection of the material into the mouse brain, a lag period of approximately 10 min was estimated to be required for the manipulation of the pre-gel solution from sonication until injection and final gelation within the tissue. A total of twelve different sonication conditions were screened that differed in amplitude, sonication time, number of sonication pulses and SF concentrations. An initial screening was performed using a single sonication pulse on SF solutions at 1% and 2% (w/v) in PBS. The duration of the pulse was 30 s, and the values of the amplitude were 20%, 40% and 60% amplitudes (the maximum amplitude value was 60%). The gelation time was assigned to the moment when the solution no longer flowed. None of the one-pulse conditions allowed the solutions to gel before 120 min, indicating that more intense sonication treatments might be required to reach gelation within the first 10 min. Therefore, solutions at the two different SF concentrations were subjected to 2 sonication pulses of 30 s. Under these conditions, sonication at amplitudes of 20% and 40% did not lead to a shortening of the gelation period. Only a 60% amplitude significantly reduced the gelation time to approximately 80 min for 1% (w/v) SF solutions. Increasing the SF concentration to 2% (w/v) further decreased the gelation time and resulted in a homogeneous gelation approximately 11–12 min after sonication (last row in Table 1), which is an adequate timeframe for material injection. All gelation conditions are summarized in Table 1,

Table 1
Screening of sonication parameters to find optimal timeframe of silk fibroin gelation. The gelation time of all tests were >120 min, except for the processes marked as (*) and (**) with average gelation times of 82 min and 12 min, respectively. The conditions of process (**) were selected and used for *in situ* formation of the SF hydrogels.

SF solution concentration	Sonication parameters		Gelation time (min)	
	Time (s)	Amplitude (%)	Sample 1	Sample 2
1% (w/v)	30	20	>120	>120
	30	40		
	30	60		
	30 + 30	20	86	77
	30 + 30	40		
	30 + 30 (*)	60		
2% (w/v)	30	20	>120	>120
	30	40		
	30	60		
	30 + 30	20	11	12
	30 + 30	40		
	30 + 30 (**)	60		

which shows the values obtained for the two samples prepared for each set of conditions in order to check the reproducibility of the procedure.

The gelation process was further analyzed under the aforementioned conditions by both UV/Vis spectrophotometry and ATR-FTIR. UV/Vis measurements of sonicated SF solution allowed the monitoring of SF gelation because turbidity increases during the gelation process. Fig. 1A shows the progression of the gelation of 2% SF solution at the chosen sonication conditions (2 pulse 30 s, at 60% amplitude). Although the gelation time was 11–12 min according to the non-flow criterion, optical density measurements revealed that gelation proceeded linearly up to approximately 1 h, when the process slowed and finally stabilized starting at 2.5 h.

ATR-FTIR was performed to monitor the conformational changes of SF protein during gelation, which is caused by the formation of β -sheets [27]. The amide I region between 1600 and 1700 cm^{-1} is assigned to the absorption of the secondary structures of proteins. FTIR data were collected from the lyophilized freshly prepared solution before sonication and from lyophilized gels at different time points after sonication (Fig. 1B). The spectrum of fibroin before gelation showed a peak centered at 1640 cm^{-1} , which indicates the presence of primarily random coil and/or α -helix conformations [28]. In contrast, in SF gels after 5 h of sonication, the peak clearly shifted to a value of 1620 cm^{-1} , a region assigned to β -sheet conformation [28],

which confirms the formation of the hydrogel. Interestingly, 10 min after sonication – close to the gelation time established by the no-flow criterion (Table 1) –, the amide I peak remained centered at 1640 cm^{-1} , and only a slight shoulder appeared near 1620 cm^{-1} , which corresponded to a very low β -sheet content (Fig. 1B). Therefore, although the entire gelation process under the studied conditions proceeded for hours, the few β -sheet crosslinks established during the first minutes seem to be sufficient to ensure a non-flowing state a few minutes after injection, which should avoid SF solution spreading through the surrounding tissue.

The SF hydrogels were also mechanically characterized by unconfined compression tests performed on gels with 1% and 2% (w/v) SF concentration. Table 2 summarizes the mechanical properties of the hydrogels obtained from two (tests in air) or four (tests in PBS) different samples for each SF concentration. The mechanical properties measured in air and in PBS did not differ; indicating the absence of a stiffening effect due to water evaporation during the time elapsed for the assays conducted in air. Both hydrogels supported approximately 10% deformation before breakage, but the SF concentrations directly correlated with the stiffness and tensile strength of the hydrogel, as expected. The elastic moduli were 6 ± 1 kPa and 30 ± 10 kPa at SF concentrations of 1% and 2% respectively, and these values are in the range of typical neural tissue mechanical properties [29,30]

Fig. 1. Characterization of silk fibroin gelation. (A) Optical density changes at 550 nm over time. (B) FTIR amide I band spectra before sonication ($t = 0$ min) and 10 min and 5 h after sonication. Silk samples were lyophilized and measurements were taken on the lyophilized material. Sonication conditions: 2% (w/v) SF solution, 2 pulses of 30 s at 60% amplitude.

Table 2

Summary of the mechanical properties as obtained from compression tests of 1% and 2% (w/v) silk fibroin (SF) from assays in air and in PBS. Values are presented as mean $\pm$ standard deviation. Two tests for each concentration were performed in air and four for each concentration were performed in PBS. A compression modulus of 49.1 and 46.8 was reported for the mouse and rat brain [30]. In other study, a stiffness of 25.0 was described for the mouse brain [29].

SF concentration	Elastic Moduli E (kPa)		Strain at break ϵ_u (%)		Stress at break σ_u (kPa)	
	Air	PBS	Air	PBS	Air	PBS
1% (w/v)	6.3 $\pm$ 0.6	6 $\pm$ 1	8 $\pm$ 2	9.8 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.1	0.49 $\pm$ 0.07
2% (w/v)	35 $\pm$ 1	30 $\pm$ 10	8.6 $\pm$ 0.3	10 $\pm$ 2	2.7 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.6

3.2. Cellular/tissue changes in the brain parenchyma after silk fibroin injection

We designed a set of experiments to verify the suitability of the manipulation and injection of SF, as well as to examine the bioreponses of brain tissue after the stereotaxic implantation of SF into the caudate putamen (Supplementary Fig. S1A), a brain region that has been previously used to engraft distinct biomaterials alone or in combination with different stem cells in models of brain damage and neurodegeneration [8,31–35]. In these studies, the mice were split into two groups: one group of mice was injected with SF, and the other group was injected with an equivalent amount of physiological saline (PBS).

Within the first 48 h of the stereotaxic injection of saline or SF, on average, approximately ninety percent of the animals remained alive in both groups of mice (saline: 93.3%; SF: 93.2%) in all studies (Supplementary Table 1). In surviving mice, we identified the presence of SF deposits in the injected hemisphere (Fig. 2A and C; panel ii). A progressive reduction in the size of these deposits was observed over the time, suggesting that this material degraded in the brain tissue (Fig. 2B). No specific attempt for characterizing the microstructure of the *in vivo* formed gels or their biodegradation was undertaken. The only relevant parameter characterized in this study was the apparent area of the SF gel deposits as observed from histological sections with the optical microscope. Close to the SF deposits various regions appeared to be hyperdense (Fig. 2C, panel ii and Supplementary Fig. S1B). This cellular density was mostly located at the borders of the deposits and decreased progressively with time after transplantation. Equivalent changes were detected in the group of mice injected with saline solution (Fig. 2A and C; panel i). The high cell density surrounding the SF deposits might reflect both the activation of host microglia (CD45^{low}) and the infiltration of white blood cells (CD45^{high}) as part of the neuroimmune response against the stereotaxic injection itself and the presence of SF in the brain parenchyma. Seventy-two hours after injection, we detected a significant amount of CD45 cells in mice transplanted with SF (Fig. 3). Although the amount of CD45 cells was smaller in the PBS group, it was significantly higher than the scores found in the intact hemisphere of non-injected mice (Fig. 3C). By contrast, high number of CD45 cells were markedly detected in the damaged hemisphere of mice submitted to cortical infarction (Fig. 3C and Supplementary Fig. S2), which were used as positive control of inflammation. The inflammatory cells were located near the site of injection and at the borders of the SF deposits, and this pattern coincided with the pattern of cellular hyperdensity (Fig. 2). At later times after injection and in correlation with the results of histological analysis, the number of CD45 cells declined over time, reaching values in the saline and SF groups similar to those found in the non-injected mice.

We also examined the possible cytotoxicity induced by this biomaterial by labeling cells with propidium iodide (PI), which preferentially labels necrotic cells with a leaky membrane and apoptotic cells that lose their membrane integrity especially at late stages. Cell death was detected in mice submitted to cortical infarction, which were used as positive control of cell mortality (Fig. 4C and

Supplementary Fig. S3). In the mice transplanted with PBS or SF, dead cells in the injected hemisphere were restricted to regions closer and bordering the injection site or the SF deposits (Fig. 4A). Cell death was evident 72 h after the stereotaxic injection in both groups of mice, whereas a remarkable reduction in cell mortality was observed 2 weeks after injection, and no evidence of cell death was detected at later time points (Fig. 4C).

Overall, our results indicate that the injection of SF caused transient changes in the brain striatum. Cell death and inflammation were higher, and this difference was observed as early as 72 h after transplantation, but both parameters changed in parallel and progressively declined over time. One month after the injection, significant cell death or an inflammatory response was not observed, despite the persistence of a SF gel deposit in the brain parenchyma at this time post-transplantation (Fig. 2).

3.3. Neurophysiological evaluation of mice transplanted with silk fibroin hydrogels

We examined the possible interference of the SF deposits with the function of the caudate putamen (striatum). The striatum is one of the major nuclei of basal ganglia with significant regulation of sleep-wake cycles [36]. It plays important roles in the acquisition and consolidation of certain forms of memory [37] and constitutes an integrative center of sensorimotor processing [38]. To examine sleep-wake cycles, cognition and sensorimotor coordination, we used different behavioral tests followed by electroencephalogram (EEG) and evoked potential recordings (Figs. 5A and 7A). The possible cognitive deficits were examined with the Y-maze spontaneous alternation test. In our hands, this test was clearly useful to detect spatial memory deficits in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease (Fig. 5B and Supplementary Fig. S4A). Using this test and with respect the baseline scores (previous to the injection), the saline and SF groups showed normal alternation performances in the Y-maze throughout the study (Fig. 5B). The total number of arm entries was similar between groups (data not shown), indicating similar levels of activity during the test performance. We also examined the brain electrical activity in both groups of mice with EEG recordings. EEG is a powerful and very sensitive technique to capture and differentiate sleep and wakefulness states, which can be seriously modified in several encephalopathies including sleep disorders, epilepsy, cerebral dementia or brain injury. In addition, lesions in the striatum cause profound sleep-wake EEG abnormalities [39–41]. To assess the different behavioral states, we recorded the EEG and electromyogram (EMG) to identify three behavioral states: wakefulness, slow-wave sleep (SWS) (also referred as non-rapid eye movement (REM) sleep), and REM sleep (Fig. 5C). We first analyzed the structure and duration of these three states throughout the entire circadian cycle, but we did not find significant differences in the percentage of time spent in the different states between the PBS and SF groups and with respect to non-injected mice (Fig. 5D). We also measured the contribution of the various frequency components of the EEG signal to each of the three states. This analysis did not reveal differences between groups in the EEG power at the frequency ranges explored for each

Fig. 2. Histological identification of silk fibroin deposits over time after intracerebral injection. (A) Representative images of coronal brain sections after Nissl staining 72 h, two weeks and four weeks after striatal injection of saline (panel i) and SF (panel ii). The arrows point out the site of saline injection and the deposits of SF (scale bar 1 mm). (B) Temporal course of SF degradation after implantation. The data are shown as the means $\pm$ the SEM of four independent experiments with 24 mice in total; 8 mice per temporal point. The asterisks denote significant differences between temporal points (one-way ANOVA; * $p < 0.05$). (C) High magnification images of saline (panel i) and SF deposits (panel ii) showed in (A) at 72 h, two weeks and four weeks after injection. The arrowheads indicate the cellular hyperdensity, which was mostly located at the borders of deposits or the site of injection and was more evident at earlier times after injection (scale bar: 200 μ m).

behavioral state (Fig. 5E). Collectively, the results of the EEG analysis suggest that the presence of SF in the striatum one month after injection did not impair sleep-wake patterns at the behavioral level or affect the normal brain electrical activity.

We previously demonstrated the efficacy of the cylinder, and especially the grid test, to examine sensorimotor skills in a mouse model of brain damage induced by focal ischemia [25]. In our study, using the grid walking test, at 72 h after SF or PBS injection (maximum inflammatory and cell death responses), the percentage of footslips using the left forepaw (contralateral to the injected

hemisphere) was significantly higher in both groups of mice with respect the baseline scores (Fig. 6A). Over time, especially 4 weeks after injection, this percentage progressively returned to values even below the baseline scores (dashed line). This pattern suggests progressive functional recovery after injection and a training effect of testing itself, i.e., motor learning could be inferred from this test when performed weekly (which was the case), and this capacity was not affected in either of the two groups, PBS or SF. The percentage of right footslips (contralateral to the non-injected hemisphere) was not affected over time in this study, and the

Fig. 3. Host immune response in the brain parenchyma after silk fibroin implantation. (A) Representative images of different brain sections immunohistochemically stained for the inflammatory marker CD45 at different time points after the injection of saline (panel i) or SF (panel ii). The dashed lines denote the limit of fibroin deposits. The direction of the white arrowheads indicates the interior of SF deposits (scale bar: 100 μm). Note that most positive cells were located at the borders of SF deposits and at the site of injection in the saline group. (B) Example flow cytometry plots summarizing the experimental strategy to identify inflammatory CD45⁺ cells in the brains of mice injected with saline or SF, as defined in the experimental procedures section. (C) Quantification of immunophenotypically identified CD45⁺ cell populations over time after injection. The white bars represent the group of mice injected with saline and the black bars represent the SF mice. The dashed and grey bars represent the percentage of CD45 cells in non-injected (non-damaged) and stroke (damaged) mice respectively. Data are shown as the means ± SEM of three independent experiments with 7–8 mice per temporal point and group (saline or SF); 9 mice in each control group (non-injected or stroke). The asterisks denote significant differences with respect the non-injected mice (two-way ANOVA followed by Tukey's test and *t*-test student; **p* < 0.05; ***p* < 0.01).

performances of mice progressively improved during consecutive trials as expected (Fig. 6B). To evaluate forepaw asymmetry, we used the cylinder test and found that after injection, both groups of mice exhibited no preference regarding the use of a particular paw over time (Supplementary Fig. S4B). In a different set of animals, a complementary readout was obtained by examining the fitness of somatosensory cortex in mice implanted with SF. The somatosensory function was explored via a reductionist approach based on the recordings of somatosensory evoked potentials (SSEPs) after forepaw electrical stimulation (Fig. 7A). One

month after SF injection, when sensorimotor deficits could not be detected in the grid and cylinder tests, the somatosensory potentials generated in both hemispheres (injected and non-injected) after contralateral stimulation were similar between the saline and SF groups (Fig. 7B–E). In addition, the evoked potentials after ipsilateral stimulation exhibited smaller amplitudes than that of the contralateral stimulation, but similarly, these potentials did not differ between saline and SF mice (Supplementary Fig. S5). These scores in amplitudes and latencies did not essentially differ from the SSEPs values recorded in non-injected mice, as we

Fig. 4. Transitory changes of cell death in the brain tissue after silk fibroin implantation. (A) Representative images of different brain sections labeled with propidium iodide (PI). Most of dead cells were located at the site of injection and surrounding the SF deposits (scale bar: 100 μ m). (B) Example of flow cytometry analysis of PI-positive cells. (C) Quantification of cell death populations over time after injection. The white bars represent the saline group, and the black bars represent the SF mice. The dashed and grey bars show the percentage of dead cells in the brains of non-damaged (craniotomized) and damaged (stroke) mice respectively. Data are shown as the means $\pm$ SEM of two independent experiments with 6 mice per temporal point and group (saline or SF); 6 mice in each control group (craniotomized or stroke). The asterisks indicate significant differences with respect the non-damaged mice (two-way ANOVA followed by Tukey's test and *t*-test student; **p* < 0.05; ***p* < 0.01).

recently described [25]. The values of latency to the main peak of potential after contralateral or ipsilateral stimulation were in the range of normality for saline and SF animals suggesting normal interhemispheric connectivity after SF implantation. Therefore, sensorial and motor skills were not affected one month after injection of SF. The absence of cognitive or sensorimotor deficits could not be assigned to the complete degradation of SF, because as described above for the inflammation and cell death analysis (Fig. 2), the biomaterial remained in the brain tissue (striatum) at the end of the behavioral and electrophysiological studies (Supplementary Fig. S6).

4. Discussion

Because most patients with brain injury fall outside of clinical time windows for neuroprotective treatments, new approaches for enhancing brain repair and promoting functional recovery are being examined. Stem cell-based therapies have been widely used in animal models of brain injury [42], and small-scale clinical trials have reported some potential recovery [43,44], although the relationship between clinical benefits and mechanisms of action of stem cells is not well understood.

Fig. 5. Cognitive function and neurophysiological evaluation of mice implanted with silk fibroin hydrogels. (A) Experimental approach for the examination of cognitive and sensorimotor functions in mice injected with saline or SF solutions. Three behavioral tests (Y-maze, grid walking and cylinder tests) were used to evaluate the influence of striatal implantation of SF over the progression of sensorimotor and cognitive abnormalities. At 5–6 weeks after SF implantation, electroencephalogram and electromyogram recordings were performed to capture and differentiate sleep and wakefulness states as well to analyze the EEG power spectra for each consciousness state. (B) Evaluation of spatial working memory with the Y-maze test. It is showed the percentage of alternation over time after injection of saline (white bars) and SF (black bars). Baseline scores (before injection) are indicated by a dashed bar. A grey bar shows the scores for 5XFAD (Alzheimer's disease model) mice. Data are shown as the means $\pm$ SEM of two independent experiments with a minimum of 9–10 mice per temporal point and group; 8 mice in the 5XFAD group. The asterisk denotes significant differences with respect the baseline (two-way ANOVA followed by Tukey's test and *t*-test student; $p < 0.05$). (C) Representative examples of EEG-EMG signals in different sleep-wake stages. Muscle tone was present on the EMG during wakefulness (top) when combined with low-amplitude irregular EEG (quiet waking) or with regular theta rhythm (active waking). The lower EMG activity was present in both SWS and REM sleep; while in the EEG the high amplitude in the delta band (1–4 Hz) was observed in SWS (middle), a high-amplitude synchronized theta activity (4.5–8.5 Hz) rhythm corresponded to REM sleep (bottom). (D) Time spent in sleep and wake states over the entire period of recording (24 h) in saline (white bars) and SF (black bars) injected animals. The grey bars represent the control group (non-injected mice). (E) Spectral power distribution of cortical EEG for different sleep-wake states in saline (blue), SF (black) and control-non-injected (red) animals. Data are shown as the means $\pm$ SEM of two independent experiments with a minimum of 9–10 mice per group (two-way ANOVA followed by Scheffé's *F*-test). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Fig. 6. Evaluation of sensorimotor and learning functions in mice implanted with silk fibroin hydrogels. With the grid-walking test was analyzed the temporal progression of sensorimotor function after injection of saline (white bars) or SF (black bars). The dashed bars represent the baseline values, before the stereotaxic injection. (A) & (B) show the percentages of footslips for the left and right forepaws, respectively. Note the progressive better performances with both forepaws for all groups of mice suggesting a training effect. The data are shown as the means $\pm$ SEM of two independent experiments with a minimum of 9–10 mice per temporal point and group. The asterisks denote significant differences with respect the corresponding baseline values (two-way ANOVA followed by Tukey's test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Fig. 7. Evaluation of somatosensory function after intraatrial injection of silk fibroin. (A) Experimental approach to examine the function of the somatosensory cortex with somatosensory evoked potentials (SSEPs) that were recorded five weeks after the injection of saline or SF. The sensorimotor coordination was evaluated by the grid test at baseline (before injection) and 4 weeks (after injection), immediately before the implantation of electrodes to perform the SSEPs. (B & D) Examples of SSEPs recorded from the non-injected and injected hemispheres in response to contralateral forepaw stimulation. On the left side, cartoon showing the position of electrodes for contralateral recordings in relation with the injected hemisphere (grey area) and the stimulated forepaw. (C & E) Amplitude and latency values of the mean peak (arrows in B and D) generated after contralateral stimulation. The white bars represent the group of mice injected with saline and the black bars represent the SF group. Data are shown as the means $\pm$ SEM of two independent experiments with 10 mice per group (t -test student).

SF can support the growth of several cell populations that are native to nervous tissue, such as neurons and astrocytes [45–48]. In addition, silk microspheres have been used for the controlled release of antiepileptic drugs [16]. However, we lack information on global brain activity and animal behavior after SF implantation, which could provide a more comprehensive vision of the safety and tolerability of this biomaterial when it interacts with the nervous tissue *in vivo*.

In this study we examined the short- and long-term brain compatibility of an *in situ* gelled SF implanted in the caudate putamen (striatum). This region has been targeted previously with different stem cells and biomaterials to repair the brain in neurodegenerative and cerebrovascular disorders [49–52]. Loss of neuronal cells is commonly observed in the striatum of patients with Huntington's and Parkinson's diseases. Striatal cell transplantation is indicated to reinnervate the denervated striatum and enhance functional recovery in these disorders [53,54]. In the context of experimental stroke, the transplantation in the striatum might be justified especially in lacunar strokes, which are associated to the occlusion of one of the penetrating arteries that provides blood to basal ganglia. In cortical strokes, the transplantation into well-perfused healthy tissue (directly in the periphery of the infarct; e. g., the striatum) might be more beneficial [55]. By contrast, because post-stroke regeneration occurs in the peri-infarct tissue, it has been suggested that the injection of therapeutic cells and biomaterials in the periphery could be counterproductive, despite the intracerebral injection of stem cells in peri-infarct areas has been associated with improvement of neurological function in stroke patients [56]. The rodent striatum is also localized close to the subventricular zone (SVZ), the main site of neurogenesis, and the striatal transplantation of neurotrophic factors-secreting cells linked with biomaterials may increase the proliferation and migration of neuroblasts from the SVZ to peri-lesional and damaged areas.

Our *in vivo* study indicates that the striatal injection of SF was reasonably well tolerated by the animals because the survival rate exceeded 90% and was similar to that of the saline group. Mouse mortality occurred within 24–48 h of injection and could be attributable to the surgical procedure. Once inside the brain, SF exhibited acceptable biocompatibility with the tissue, especially two weeks after injection, after which the SF deposits did not elicit cell death, foreign body reactions or behavioral deficits of consideration. In agreement with our results, the different formats of SF transplanted into the brain induced low gliosis and inflammatory responses that were often transitory [16,47,57,58]. This mild inflammatory response is also in agreement with the host response described in other tissues transplanted with silk, such as the muscle [59], skin [60] or bone [61]. The progressive degradation of SF may result in minor immune system activation. The degradation of SF was also histologically confirmed in the brain parenchyma of rats one month after intracerebral injection [16] and has been related to the action of different brain proteases or the activation of different myeloid cells and microglia. One month after transplantation we confirmed the presence of SF deposits in the striatum. At this time point, at which SF was still present, cognitive and sensorimotor deficits were not evident by behavioral or electrophysiological analysis.

The cortex provides the major excitatory input to the striatum via the corticostriatal pathway and dysfunction of these circuits is a main cause of motor and cognitive deficits. The cylinder test, used in this study, has proven value in Parkinson's models with damage in the striatum [62]. The grid test was useful to detect early impairments (72 h) after striatal implantation of SF, deficits that were not present at later time points after the biomaterial implantation. The striatum and hippocampus cooperate in the processing of motor and sensory information and therefore in memory

spatial tasks. The Z-maze and the Y-maze tests have been employed to detect spatial memory deficits in the damaged striatum [63]. By contrast, the dysfunction of the striatum has been also associated with severe sleep-wake abnormalities with significant changes in time spent in wakefulness and fragmentation of both sleep and wakefulness [40,41]. Assessment of sleep/wakefulness in mice has been performed with digital video analysis [64] but the information obtained from these approaches can be limited with respect to the quantitative EEG used in this study.

5. Conclusions

Our findings show that SF hydrogels represent a versatile biomaterial with potential applications for CNS disorders. In agreement with previous studies of SF transplantation into other tissues, we herein corroborated the good biocompatibility of this material when injected into the mouse brain. The analysis of cell death and inflammatory response as well the brain function examined by behavioral tests and electrophysiological analysis confirm the tolerability of SF by the brain tissue. In restorative therapies, the use of different biomaterials might enhance the survival and retention of therapeutic cells. Development of biomaterials appears increasingly relevant for therapies in CNS disorders since the use of therapeutic cells alone has been associated with functional recovery, although significant side effects were also found. For instance, some stroke patients were reported to experience seizures, subdural hematomas and syncopal events after the intracerebral injection of LBS-human-neurons [65] or bone marrow mesenchymal stem cells [56]. We ignore whether the use of different biomaterials can avoid the adverse effects linked with the invasiveness of the cerebral implantation of stem cells. Our results show that, at the very least, SF hydrogels can coexist in the brain with the complex neuronal circuitry that governs the sensorimotor transformation and sophisticated mechanisms such as sleep-wake regulation, learning and memory. Our results have repercussion in the development of strategies using this biomaterial in regenerative neuroscience.

Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Author contributions

GV.G and D.G-N conceived the idea and supervised the whole project. L.F-G performed the majority of the experiments with the help of N.M-B, J.B, R.M, M.E, J.P-R, M.R and D.G-N. L.F-G, N.M-B, J.B, J.P-R -and D G-N analyzed the data and interpreted the results. N.M-B and D.G-N wrote the paper with the input from all authors.

Acknowledgements

We would like to thank Soledad Martinez for the excellent technical assistance. We also express our gratitude to the Core Facility for Flow Cytometry (Immunology Department, Hospital Ramon & Cajal, Madrid). This study was funded by the Community of Madrid Grant Neurotec-S2010/BMD-2460 (to GV.G and D.G-N).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.003>.

References

- [1] J.A. Burdick, R.L. Mauck, J.H. Gorman, R.C. Gorman 3rd., Acellular biomaterials: an evolving alternative to cell-based therapies, *Sci. Transl. Med.* 5 (176) (2013) 176ps4.
- [2] A.E. Thurber, F.G. Omenetto, D.L. Kaplan, In vivo bioresponses to silk proteins, *Biomaterials* 71 (2015) 145–157.
- [3] J. Cutts, M. Nikkha, D.A. Brafman, Biomaterial approaches for stem cell-based myocardial tissue engineering, *Biomark. Insights* 10 (Suppl. 1) (2015) 77–90.
- [4] A.S. Wahl, W. Omlor, J.C. Rubio, J.L. Chen, H. Zheng, A. Schroter, M. Gullo, O. Weinmann, K. Kobayashi, F. Helmchen, B. Ommer, M.E. Schwab, Neuronal repair. Asynchronous therapy restores motor control by rewiring of the rat corticospinal tract after stroke, *Science* 344 (6189) (2014) 1250–1255.
- [5] K. Jin, X. Mao, L. Xie, V. Galvan, B. Lai, Y. Wang, O. Gorostiza, X. Wang, D.A. Greenberg, Transplantation of human neural precursor cells in Matrigel scaffolding improves outcome from focal cerebral ischemia after delayed postischemic treatment in rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30 (3) (2010) 534–544.
- [6] E. Bible, O. Qutachi, D.Y. Chau, M.R. Alexander, K.M. Shakesheff, M. Modo, Neovascularization of the stroke cavity by implantation of human neural stem cells on VEGF-releasing PLGA microparticles, *Biomaterials* 33 (30) (2012) 7435–7446.
- [7] D.F. Emerich, E. Silva, O. Ali, D. Mooney, W. Bell, S.J. Yu, Y. Kaneko, C. Borlongan, Injectable VEGF hydrogels produce near complete neurological and anatomical protection following cerebral ischemia in rats, *Cell Transplant.* 19 (9) (2010) 1063–1071.
- [8] H. Yu, B. Cao, M. Feng, Q. Zhou, X. Sun, S. Wu, S. Jin, H. Liu, J. Lianhong, Combined transplantation of neural stem cells and collagen type I promote functional recovery after cerebral ischemia in rats, *Anat. Rec. (Hoboken)* 293 (5) (2010) 911–917.
- [9] J. Ma, W.M. Tian, S.P. Hou, Q.Y. Xu, M. Spector, F.Z. Cui, An experimental test of stroke recovery by implanting a hyaluronic acid hydrogel carrying a Nogo receptor antibody in a rat model, *Biomed. Mater.* 2 (4) (2007) 233–240.
- [10] S. Enomoto, M. Sumi, K. Kajimoto, Y. Nakazawa, R. Takahashi, C. Takabayashi, T. Asakura, M. Sata, Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material, *J. Vasc. Surg.* 51 (1) (2010) 155–164.
- [11] J. Melke, S. Midha, S. Ghosh, K. Ito, S. Hofmann, Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering, *Acta Biomater.* (2015).
- [12] S. Hofmann, S. Knecht, R. Langer, D.L. Kaplan, G. Vunjak-Novakovic, H.P. Merkle, L. Meinel, Cartilage-like tissue engineering using silk scaffolds and mesenchymal stem cells, *Tissue Eng.* 12 (10) (2006) 2729–2738.
- [13] H.J. Kim, U.J. Kim, G.G. Leisk, C. Bayan, I. Georgakoudi, D.L. Kaplan, Bone regeneration on macroporous aqueous-derived silk 3-D scaffolds, *Macromol. Biosci.* 7 (5) (2007) 643–655.
- [14] J.H. Lee, J.S. Lee, D.K. Kim, C.H. Park, H.R. Lee, Clinical outcomes of silk patch in acute tympanic membrane perforation, *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* 8 (2) (2015) 117–122.
- [15] G.P. Maxwell, B.W. Van Natta, B.P. Bengtson, D.K. Murphy, Ten-year results from the Natrelle 410 anatomical form-stable silicone breast implant core study, *Aesthet. Surg. J.* 35 (2) (2015) 145–155.
- [16] C. Szybala, E.M. Pritchard, T.A. Lusardi, T. Li, A. Wilz, D.L. Kaplan, D. Boison, Antiepileptic effects of silk-polymer based adenosine release in kindled rats, *Exp. Neurol.* 219 (1) (2009) 126–135.
- [17] S. Das, M. Sharma, D. Saharia, K.K. Sarma, M.G. Sarma, B.B. Borthakur, U. Bora, In vivo studies of silk based gold nano-composite conduits for functional peripheral nerve regeneration, *Biomaterials* 62 (2015) 66–75.
- [18] Y. Yang, X. Yuan, F. Ding, D. Yao, Y. Gu, J. Liu, X. Gu, Repair of rat sciatic nerve gap by a silk fibroin-based scaffold added with bone marrow mesenchymal stem cells, *Tissue Eng. Part A* 17 (17–18) (2011) 2231–2244.
- [19] X. Wu, J. Hou, M. Li, J. Wang, D.L. Kaplan, S. Lu, Sodium dodecyl sulfate-induced rapid gelation of silk fibroin, *Acta Biomater.* 8 (6) (2012) 2185–2192.
- [20] X. Wang, J.A. Kluge, G.G. Leisk, D.L. Kaplan, Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation, *Biomaterials* 29 (8) (2008) 1054–1064.
- [21] G.B. Perea, C. Solanas, N. Mari-Buyé, R. Madurga, F. Agulló-Rueda, A. Muñino, C. Riekel, M. Burghammer, I. Jorge, J. Vázquez, G.R. Plaza, A.L. Torres, F. Del Pozo, G.V. Guinea, M. Ellices, J.L. Cenis, J. Pérez-Rigueiro, The apparent variability of silkworm (*Bombyx mori*) silk and its relationship with degumming, *Eur. Polymer J.* 78 (2016) 129–140.
- [22] D.N. Rockwood, R.C. Preda, T. Yucel, X. Wang, M.L. Lovett, D.L. Kaplan, Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin, *Nat. Protoc.* 6 (10) (2011) 1612–1631.
- [23] H. Oakley, S.L. Cole, S. Logan, E. Maus, P. Shao, J. Craft, A. Guillozet-Bongaarts, M. Ohno, J. Disterhoft, L. Van Eldik, R. Berry, R. Vassar, Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation, *J. Neurosci.* 26 (40) (2006) 10129–10140.
- [24] I. Unal Cevik, T. Dalkara, Intravenously administered propidium iodide labels necrotic cells in the intact mouse brain after injury, *Cell Death Differ.* 10 (8) (2003) 928–929.
- [25] J.A. Barrios, L. Pisarchyk, L. Fernandez-Garcia, L.C. Barrio, M. Ramos, R. Martinez-Murillo, D. Gonzalez-Nieto, Long-term dynamics of somatosensory activity in a stroke model of distal middle cerebral artery occlusion, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 36 (3) (2016) 606–620.
- [26] Z. Sarnyai, E.L. Sibille, C. Pavlides, R.J. Fenster, B.S. McEwen, M. Toth, Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin(1A) receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (26) (2000) 14731–14736.
- [27] A. Matsumoto, J. Chen, A.L. Collette, U.J. Kim, G.H. Altman, P. Cebe, D.L. Kaplan, Mechanisms of silk fibroin sol-gel transitions, *J. Phys. Chem. B* 110 (43) (2006) 21630–21638.
- [28] X. Hu, D. Kaplan, P. Cebe, Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy, *Macromolecules* 39 (18) (2006) 6161–6170.
- [29] M.C. Murphy, G.L. Curran, K.J. Glaser, P.J. Rossman, J. Huston 3rd, J.F. Poduslo, C. R. Jack Jr., J.P. Felmlee, R.L. Ehman, Magnetic resonance elastography of the brain in a mouse model of Alzheimer's disease: initial results, *Magn. Reson. Imaging* 30 (4) (2012) 535–539.
- [30] M.D. Tang-Schomer, J.D. White, L.W. Tien, L.I. Schmitt, T.M. Valentin, D.J. Graziano, A.M. Hopkins, F.G. Omenetto, P.G. Haydon, D.L. Kaplan, Bioengineered functional brain-like cortical tissue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (38) (2014) 13811–13816.
- [31] D.F. Emerich, P.E. McDermott, P.M. Krueger, S.R. Winn, Intrastriatal implants of polymer-encapsulated PC12 cells: effects on motor function in aged rats, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 18 (5) (1994) 935–946.
- [32] M. Inden, D.H. Kim, M. Qi, Y. Kitamura, D. Yanagisawa, K. Nishimura, D. Tsuchiya, K. Takata, K. Hayashi, T. Taniguchi, K. Yoshimoto, S. Shimohama, S. Sumi, K. Inoue, Transplantation of mouse embryonic stem cell-derived neurons into the striatum, subthalamic nucleus and substantia nigra, and behavioral recovery in hemiparkinsonian rats, *Neurosci. Lett.* 387 (3) (2005) 151–156.
- [33] Y. Liang, P. Walczak, J.W. Bulte, The survival of engrafted neural stem cells within hyaluronic acid hydrogels, *Biomaterials* 34 (22) (2013) 5521–5529.
- [34] C.Y. Yang, B. Song, Y. Ao, A.P. Nowak, R.B. Abelowitz, R.A. Korsak, L.A. Havton, T. J. Deming, M.V. Sofroniew, Biocompatibility of amphiphilic diblock copolypeptide hydrogels in the central nervous system, *Biomaterials* 30 (15) (2009) 2881–2898.
- [35] J. Zhong, A. Chan, L. Morad, H.I. Kornblum, G. Fan, S.T. Carmichael, Hydrogel matrix to support stem cell survival after brain transplantation in stroke, *Neurorehabil. Neural Repair* 24 (7) (2010) 636–644.
- [36] M.H. Qiu, R. Vetrivelan, P.M. Fuller, J. Lu, Basal ganglia control of sleep-wake behavior and cortical activation, *Eur. J. Neurosci.* 31 (3) (2010) 499–507.
- [37] G. Albouy, B.R. King, P. Maquet, J. Doyon, Hippocampus and striatum: dynamics and interaction during acquisition and sleep-related motor sequence memory consolidation, *Hippocampus* 23 (11) (2013) 985–1004.
- [38] T. Sipky, D. Lapray, S. Crochet, C.C. Petersen, Cell-type-specific sensorimotor processing in striatal projection neurons during goal-directed behavior, *Neuron* 88 (2) (2015) 298–305.
- [39] C.R. Baumann, E. Kilic, B. Petit, E. Werth, D.M. Hermann, M. Tafti, C.L. Bassetti, Sleep EEG changes after middle cerebral artery infarcts in mice: different effects of striatal and cortical lesions, *Sleep* 29 (10) (2006) 1339–1344.
- [40] S.P. Fisher, S.W. Black, M.D. Schwartz, A.J. Wilk, T.M. Chen, W.U. Lincoln, H.W. Liu, T.S. Kilduff, S.R. Moraity, Longitudinal analysis of the electroencephalogram and sleep phenotype in the R6/2 mouse model of Huntington's disease, *Brain* 136 (Pt 7) (2013) 2159–2172.
- [41] V.V. Vorobyov, N.V. Schibaev, M. Morelli, A.R. Carta, EEG modifications in the cortex and striatum after dopaminergic priming in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease, *Brain Res.* 972 (1–2) (2003) 177–185.
- [42] J.A. Steinbeck, L. Studer, Moving stem cells to the clinic: potential and limitations for brain repair, *Neuron* 86 (1) (2015) 187–206.
- [43] O.Y. Bang, J.S. Lee, P.H. Lee, G. Lee, Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients, *Ann. Neurol.* 57 (6) (2005) 874–882.
- [44] J.S. Lee, J.M. Hong, G.J. Moon, P.H. Lee, Y.H. Ahn, O.Y. Bang, A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke, *Stem Cells* 28 (6) (2010) 1099–1106.
- [45] V. Benfenati, S. Toffanin, R. Capelli, L.M. Camassa, S. Ferroni, D.L. Kaplan, F.G. Omenetto, M. Muccini, R. Zamboni, A silk platform that enables electrophysiology and targeted drug delivery in brain astroglial cells, *Biomaterials* 31 (31) (2010) 7883–7891.
- [46] X. Tang, F. Ding, Y. Yang, N. Hu, H. Wu, X. Gu, Evaluation on in vitro biocompatibility of silk fibroin-based biomaterials with primarily cultured hippocampal neurons, *J. Biomed. Mater. Res. A* 91 (1) (2009) 166–174.
- [47] M.D. Tang-Schomer, X. Hu, M. Tupaj, L.W. Tien, M. Whalen, F. Omenetto, D.L. Kaplan, Film-based implants for supporting neuron-electrode integrated interfaces for the brain, *Adv. Funct. Mater.* 24 (13) (2014) 1938–1948.
- [48] Y. Zhao, W. Zhao, S. Yu, Y. Guo, X. Gu, Y. Yang, Biocompatibility evaluation of electrospun silk fibroin nanofibrous mats with primarily cultured rat hippocampal neurons, *Biomed. Mater. Eng.* 23 (6) (2013) 545–554.
- [49] P. Aebischer, M. Goddard, A.P. Signore, R.L. Timpson, Functional recovery in hemiparkinsonian primates transplanted with polymer-encapsulated PC12 cells, *Exp. Neurol.* 126 (2) (1994) 151–158.
- [50] C.V. Borlongan, C.G. Thanos, S.J. Skinner, M. Geaney, D.F. Emerich, Transplants of encapsulated rat choroid plexus cells exert neuroprotection in a rodent model of Huntington's disease, *Cell Transplant.* 16 (10) (2008) 987–992.
- [51] G.J. Delcroix, E. Garbayo, L. Sindji, O. Thomas, C. Vanpouille-Box, P.C. Schiller, C. N. Montero-Menei, The therapeutic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells combined with pharmacologically active microcarriers transplanted in hemi-parkinsonian rats, *Biomaterials* 32 (6) (2011) 1560–1573.

- [52] J. Wang, W. Yang, H. Xie, Y. Song, Y. Li, L. Wang, Ischemic stroke and repair: current trends in research and tissue engineering treatments, *Regen. Med. Res.* 2 (1) (2014) 3.
- [53] C.R. Freed, P.E. Greene, R.E. Breeze, W.Y. Tsai, W. DuMouchel, R. Kao, S. Dillon, H. Winfield, S. Culver, J.Q. Trojanowski, D. Eidelberg, S. Fahn, Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease, *N. Engl. J. Med.* 344 (10) (2001) 710–719.
- [54] S.V. Precious, A.E. Rosser, Producing striatal phenotypes for transplantation in Huntington's disease, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 237 (4) (2012) 343–351.
- [55] S. Mora-Lee, M.S. Sirerol-Piquer, M. Gutierrez-Perez, U. Gomez-Pinedo, V.D. Roobrouck, T. Lopez, M. Casado-Nieto, G. Abizanda, M.T. Rabena, C. Verfaillie, F. Prosper, J.M. Garcia-Verdugo, Therapeutic effects of hMAPC and hMSC transplantation after stroke in mice, *PLoS One* 7 (8) (2012) e43683.
- [56] G.K. Steinberg, D. Kondziolka, L.R. Wechsler, L.D. Lunsford, M.L. Coburn, J.B. Billigen, A.S. Kim, J.N. Johnson, D. Bates, B. King, C. Case, M. McGrogan, E.W. Yankee, N.E. Schwartz, Clinical outcomes of transplanted modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells in stroke: a phase 1/2a study, *Stroke* 47 (7) (2016) 1817–1824.
- [57] D.H. Kim, J. Viventi, J.J. Amsden, J. Xiao, L. Vigeland, Y.S. Kim, J.A. Blanco, B. Panilaitis, E.S. Frechette, D. Contreras, D.L. Kaplan, F.G. Omenetto, Y. Huang, K. C. Hwang, M.R. Zakin, B. Litt, J.A. Rogers, Dissolvable films of silk fibroin for ultrathin conformal bio-integrated electronics, *Nat. Mater.* 9 (6) (2010) 511–517.
- [58] D.W. Kim, W.S. Eum, S.H. Jang, J. Park, D.H. Heo, S.H. Sheen, H.R. Lee, H. Kweon, S.W. Kang, K.G. Lee, S.Y. Cho, H.J. Jin, Y.J. Cho, S.Y. Choi, A transparent artificial dura mater made of silk fibroin as an inhibitor of inflammation in craniotomized rats, *J. Neurosurg.* 114 (2) (2011) 485–490.
- [59] L. Meinel, S. Hofmann, V. Karageorgiou, C. Kirker-Head, J. McCool, G. Gronowicz, L. Zichner, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan, The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo, *Biomaterials* 26 (2) (2005) 147–155.
- [60] G. Guan, L. Bai, B. Zuo, M. Li, Z. Wu, Y. Li, L. Wang, Promoted dermis healing from full-thickness skin defect by porous silk fibroin scaffolds (PSFSs), *Biomed. Mater. Eng.* 20 (5) (2010) 295–308.
- [61] L. Uebersax, T. Apfel, K.M. Nuss, R. Vogt, H.Y. Kim, L. Meinel, D.L. Kaplan, J.A. Auer, H.P. Merkle, B. von Rechenberg, Biocompatibility and osteoconduction of macroporous silk fibroin implants in cortical defects in sheep, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85 (1) (2013) 107–118.
- [62] S.M. Fleming, O.R. Ekhtor, V. Ghisays, Assessment of sensorimotor function in mouse models of Parkinson's disease, *J. Vis. Exp.* (76) (2013).
- [63] S. Gengler, H.A. Mallot, C. Holscher, Inactivation of the rat dorsal striatum impairs performance in spatial tasks and alters hippocampal theta in the freely moving rat, *Behav. Brain Res.* 164 (1) (2005) 73–82.
- [64] A.I. Pack, R.J. Galante, G. Maislin, J. Cater, D. Metaxas, S. Lu, L. Zhang, R. Von Smith, T. Kay, J. Lian, K. Svenson, L.L. Peters, Novel method for high-throughput phenotyping of sleep in mice, *Physiol. Genomics* 28 (2) (2007) 232–238.
- [65] D. Kondziolka, G.K. Steinberg, L. Wechsler, C.C. Meltzer, E. Elder, J. Gebel, S. Decesare, T. Jovin, R. Zafonte, J. Lebowitz, J.C. Flickinger, D. Tong, M.P. Marks, C. Jamieson, D. Luu, T. Bell-Stephens, J. Teraoka, Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial, *J. Neurosurg.* 103 (1) (2005) 38–45.

Long-term dynamics of somatosensory activity in a stroke model of distal middle cerebral artery occlusion

Juan A Barrios¹, Liudmila Pisarchyk¹, Laura Fernandez-Garcia¹, Luis C Barrio², Milagros Ramos^{1,4}, Ricardo Martinez-Murillo³ and Daniel Gonzalez-Nieto^{1,4}

Abstract

A constant challenge in experimental stroke is the use of appropriate tests to identify signs of recovery and adverse effects linked to a particular therapy. In this study, we used a long-term longitudinal approach to examine the functional brain changes associated with cortical infarction in a mouse model induced by permanent ligation of the middle cerebral artery (MCA). Sensorimotor function and somatosensory cortical activity were evaluated with fault-foot and forelimb asymmetry tests in combination with somatosensory evoked potentials. The stroke mice exhibited both long-term deficits in the functional tests and impaired responses in the infarcted and intact hemispheres after contralateral and ipsilateral forepaw stimulation. In the infarcted hemisphere, reductions in the amplitudes of evoked responses were detected after contralateral and ipsilateral stimulation. In the intact hemisphere, and similar to cortical stroke patients, a gradual hyperexcitability was observed after contralateral stimulation but no parallel evidence of a response was detected after ipsilateral stimulation. Our results suggest the existence of profound and persistent changes in the somatosensory cortex in this specific mouse cortical stroke model. The study of evoked potentials constitutes a feasible and excellent tool for evaluating the fitness of the somatosensory cortex in relation to functional recovery after pre-clinical therapeutic intervention.

Keywords

Behavior, somatosensory evoked potentials, stroke neuroprotection and repair

Received 2 February 2015; Revised 27 July 2015; Accepted 28 July 2015

Introduction

Stroke is a leading cause of death and a major cause of disability in the Western world. Embolisms of the cerebral arteries beyond the circle of Willis, account itself for 15–30% of strokes.¹ Currently, early revascularization by intravenous thrombolysis or intra-arterial mechanical thrombolysis is the only accepted treatment to promote early reperfusion to improve survival and prevent long-term disability in patients. Preclinical models are needed to investigate the pathogenesis of stroke and the development of neuroprotective or restorative therapies. Animal models of focal ischemia induced by the occlusion of the MCA have been developed to reproduce the most frequent form of stroke in humans.² The proximal occlusion of the MCA results in focal ischemia that causes an extensive damage in the cortex and striatum. By contrast, the occlusion of the

distal part of the MCA (dMCAO) causes damage that is primarily restricted to the frontal and parietal

¹Unit of Cellular and Animal models, Experimental Neurology Laboratory, Center for Biomedical Technology, Universidad Politécnica, Madrid, Spain

²Unit of Experimental Neurology, Hospital Universitario Ramón y Cajal-IRYCIS, Madrid, Spain

³Department of Molecular, Cellular and Developmental Neurobiology, Instituto Cajal (CSIC), Madrid, Spain

⁴Biomedical Research Networking Center in Bioengineering Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Madrid, Spain

Corresponding author:

Daniel Gonzalez-Nieto, Unit of cellular and animal models, Experimental Neurology Laboratory, Center for Biomedical Technology, Universidad Politécnica de Madrid. Campus de Montegancedo S/N, Pozuelo de Alarcón, Madrid 28223, Spain.
Email: daniel.gonzalez@ctb.upm.es

cortices, which results in infarct size reproducibility across animals;^{3,4} however, the sensory deficits are relatively minor, which limits the evaluation of the effects of chronic treatments for stroke and the ability to examine possible long-term side effects.

In this context, the use of electroencephalography (EEG) and somatosensory evoked potentials (SSEPs) has been shown to be useful for exploring the integrity of the sensory pathways of the central nervous system. The value of SSEPs in the prediction of functional recovery after stroke has also been examined and found to correlating well with the subsequent level of disability and functional outcome.⁵ In cortical stroke models that affect the somatosensory area, SSEPs constitute an advantageous methodology for examining spontaneous and therapy-induced functional recovery, specifically when conventional behavioral tests are not sensitive enough. In rats submitted to focal ischemia, SSEPs have served to evaluate both the efficiency of MCA occlusion during the surgery^{6,7} and the long-term sensory deficits that follow various treatments applied during the acute and chronic phases of stroke.⁸ However, the use of SSEPs has been more restricted in mouse models, despite the fact that genetically modified animals permit the exploration of the contributions of different genes to the physiopathology of stroke and their implications in neuroprotection and brain repair mechanisms. In few recent studies, the activity of infarcted cortex has been examined in mice with techniques with good temporal resolution such as electrophysiology and voltage-sensitive dye (VSD) imaging.^{9,10} Chronic electrophysiological recordings enable examination of the short- and long-term progression of somatosensory function in the same animal even when the field potentials are relatively low in amplitude as occurs, for example, after ipsilateral stimulation. Therefore, the use of electrophysiological recordings together with brain imaging might be useful for exploring the mechanisms of functional recovery that are associated with neuroprotection, neurorestoration, and cortical reorganization after different pharmacologic or stem cell transplantation approaches.

The aim of this study was to examine the feasibility of the use of long-term longitudinal electrophysiological recordings in mice to analyze the dynamic progression of somatosensory function in a specific model of dMCAO. After stroke, the infarcted mice exhibited permanent failures in the fault-foot and forelimb asymmetry tests, and greater deficits in both of these behavioral tests were correlated with greater dysfunction in the somatosensory cortex. Our results highlight the sensitivity and reproducibility of SSEPs in the exploration of post-ischemic mechanisms of cortical functionality in stroke and after preclinical therapeutic interventions.

Materials and methods

Additional method details can be found in supplementary information (available on the JCBFM website; see the supplementary information link at the top of the online article).

Animals

Adult male C57BL/6 mice (20–28 g body weight; 8–10 weeks old) were bred and housed in the animal facility of the Center for Biomedical Technology. The animals were housed in individual cages with free access to food and water in an animal room with a controlled temperature and a natural light cycle. Daily routines were performed between 7 a.m. and 4 p.m. by authorized personnel. The experimental setup of this study is illustrated in Figure 1 and is also described in the supplementary information. All procedures were approved by the Technical University of Madrid (Ethical Committee for Animal Research) before the commencement of any of the studies. All procedures were performed under the Spanish Regulations for animal experimentation (Law 53/2013) and according to the ARRIVE (animal research: reporting in vivo experiments) guidelines.

Stereotaxic surgery and SSEPs recordings

Animals were anesthetized with ketamine (100 mg/Kg) and xylazine (10 mg/kg) prior to the stereotaxic implantation of subdural electrodes for recording of SSEPs. The mice were secured in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, California, USA) and under aseptic conditions a skin incision was made and four small holes drilled through the skull. The electrodes (0.2 mm diameter) were made with polyimide-insulated stainless steel wires (PlasticsOne, Virginia, USA). Two electrodes were implanted in the right and left somatosensory cortices (± 2.0 mm lateral and $+0.5$ mm rostrocaudal from bregma, depth 0.5 mm). Two screws were placed over the visual cortex of both hemispheres and served as the indifferent and ground electrodes (± 2.0 mm lateral and -3 mm rostrocaudal from bregma). The electrodes were secured in place with cyanoacrylate-based glue and dental acrylate (Duraly, Illinois, USA). The animals were allowed two weeks to recover from surgery before experiments started. The electrodes placement was assessed following the recording of SSEPs from both hemispheres after ipsi- and contra-lateral forelimb stimulation to obtain the baseline scores. One week later, focal cerebral ischemia was induced by direct occlusion of the distal MCA as described below. Brain histology was also performed in some mice to examine the relative position of the

Figure 1. Experimental approach for the examination of the temporal progression of somatosensory cortical activity and sensorimotor function in mice submitted to permanent distal MCA occlusion. Somatosensory evoked potentials (SSEPs) and two behavioral tests (grid-walking and cylinder tests) were used to evaluate the influence of cortical infarction on the progression of sensorimotor deficits and the subsequent recovery. The functional tests and the SSEPs recordings were performed two weeks after implantation of epidural electrodes (stereotaxic surgery) to obtain the baseline scores. One week later, we induced the cortical infarction in the same mice by occlusion of the distal part of the middle cerebral artery (dMCAO). After stroke, the behavioral tests were performed at 1, 3, 6, and 8 weeks post-stroke, while the SSEPs were performed every week during the first month after ischemia, and every two weeks during the last month of study.

electrodes in the somatosensory cortex (Supplementary Figure S3).

Electrical stimulation and SSEPs recordings were performed under anesthesia with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The SSEPs were recorded during the first 10–25 min after i.p. injection of anesthesia, a time period of stable SSEPs amplitudes (Supplementary Figure S4). The depth of anesthesia was assessed as a function of the loss of reflex tail movement after pinch and the amplitude of the EEG signal. For peripheral stimulation, a tape was used to affix a pair of silver electrodes over the ventral surface of forelimb (distal to the elbow) along the median nerve pathway. The stimuli were applied with a frequency of 1 Hz. In all the cases, the magnitude of applied electrical stimuli was twice the current level necessary to obtain a supramaximal motor response (1–2 mA; 0.5 ms duration). This current level is defined as the value of intensity able to elicit a visually evident and specific movement in the forepaw (palmar flexion of wrist), which is not significantly modified after increasing the stimulation intensity. Signals were amplified ($\times 10^3$) and filtered (band-pass, 10–2,000 Hz) using a portable electromyography (EMG)-evoked potentials (EP) device (Micromed, Mogliano Veneto, Treviso, Italy); 30 to 60 responses were averaged for each trial, and the procedure was repeated three times for each forepaw.

Permanent MCA occlusion

Focal cerebral ischemia was induced by direct occlusion of the distal part of the middle cerebral artery (MCA)

as we have described previously.¹¹ Briefly, mice were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). A vertical skin incision (0.5 cm) was made between the right eye and ear under a dissection microscope (Amscope, California, USA), and the temporal muscle was cut and separated to expose the right lateral aspect of the skull. The MCA was identified through the semi-translucent skull, and a burr hole (0.8 mm diameter) was made using a microdrill. After identification, the dura mater was resected, and the artery was ligated distal to the lenticulostriate branches. Sham operated animals were subjected to an identical procedure with the exception that MCA was not ligated.

Infarct volume and area measurement

The infarcted area was evaluated with the 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC; Sigma, St. Louis, MO, USA) staining.¹² Briefly, the mice were sacrificed by decapitation 24–72 h after MCA ligation. The brains were removed and sliced in 1-mm-thick coronal sections by using a brain matrix (WPI, Florida, USA). The brain slices were immersed in a solution containing 1% of TTC in phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature for 10 min and fixed with 4% paraformaldehyde solution in PBS. All coronal sections were digitized, and the area of cerebral damage was traced with a standard computer-assisted image analysis technique (Image J software; NIH). The volumes of the healthy and ischemic tissues in both hemispheres were calculated by measuring the infarcted and the undamaged areas on separate slices, multiplying the areas by the slice thickness, and summing the values for all

slices. The infarct percentages were calculated as percentages of the contralateral (intact) hemisphere to correct for edema.

Behavioral tests

Cylinder test. The cylinder test has been used to demonstrate long-term functional impairments in rats and mice that have been subject to cortical ischemia affecting the somatosensory area.^{13,14} To evaluate forepaw asymmetry, the mice were placed in a clear Plexiglas cylinder (15 cm in height $\times$ 10 cm in diameter). During normal vertical exploration, the animal supports its weight on either or both of its forepaws. Twenty-five contacts were counted and recorded per trial and the paw or paws used for each contact were scored. Blinded evaluation was performed on video recordings by one investigator (L.P.). The mice were placed in the cylinder for a maximum of 5 min. The laterality index was calculated as (Contacts (Right)-Contacts (Left))/(Contacts (Right) + Contacts (Left) + Contacts (Right and left)); positive scores denote preferential use of the right (unaffected) paw and negative scores indicate preferential use of the left paw.¹⁴

Fault-Foot test. The grid test was performed to evaluate the abilities of the mice to place the forepaws on a wire while moving along a grid floor during spontaneous exploration.¹⁵ We analyzed the frequencies of slips with both forepaws, which are related to the mice's abilities to accurately grasp the grid wires. The mice were placed on a circular grid with 13 $\times$ 13 mm² grid squares and allowed to freely explore for 5 min. The animal behaviors were videotaped and the total numbers of right and left forepaws steps during locomotion (typical range of 200–400 total steps) and the total number of foot faults for each forelimb were scored. Blinded evaluation was performed on video recordings by L.P. A foot fault was considered positive when the respective forepaw fell or slipped between the rungs causing the animal to lose balance.

Statistical analysis

The R package and SigmaPlot (Systat, Germany) were used for the statistical analyses. All values are expressed as mean $\pm$ the standard error of the mean (S.E.M.). To examine significant differences in the volume of infarct at different time points after surgery, we performed a one-way analysis of variance (ANOVA) test. The temporal pattern of cortical activity (SSEPs) and sensorimotor function (behavioral tests) was analyzed using a two-way ANOVA, followed in case of significant differences by Tukey's post hoc test. The ANOVA analysis was performed using deficits, amplitudes or

inter-hemispheric ratios as dependent variables, and time and groups (sham & stroke) as independent variables. For SSEPs responses after contralateral stimulation, multiple comparisons for differences between different weeks and the baseline values were determined by Tukey's test. For behavioral testing and SSEPs responses after ipsilateral stimulation, differences between groups (for behavioral tests) or between hemispheres (for ipsilateral potentials) were analyzed for each temporal point by Tukey's post hoc test. Correlations between different variables were determined using the Pearson product-moment correlation coefficient. *p*-values below 0.05 were considered statistically significant.

Results

Distal permanent MCAO

Permanent occlusions of the MCA were performed at the distal level and resulted in relatively variable infarct sizes between different animals that involved the cortical areas of the distal territory of the MCA without affecting the subcortical regions as indicated by TTC staining (Figure 2(a)). The analyses of the coronal brain sections indicated that the infarcted areas were greater in the sections that primarily contained the primary somatosensory cortex (Figure 2(b)). The calculations of infarct volumes corrected for swelling due to edema that were used to examine the temporal progression of the lesions induced by dMCAO revealed no significant changes in the interval from 24 to 72 h (Figure 2(c)).

Behavioral tests of somatosensory and motor function

In the initial 6–12 h following surgery, the ischemic mice exhibited contralateral hemiparesis, but 24 h after focal ischemia, we did not detect obvious functional differences between the ischemic and sham animals. We performed a re-evaluation of different functional tests that have previously used in the models of focal and global ischemia, specifically the cylinder and the grid tests. To avoid a training effect of testing itself especially in the case of the grid test (supplementary Figures S1 and S2), both behavioral tests were performed in sham and ischemic mice in spaced weeks apart (Figure 1). Under these conditions, no habituation was observed in the sham mice across the time after surgery (Figure 3(c) and 3(d)).

In our study, the cylinder test revealed the preferential use of the paw ipsilateral to the infarcted hemisphere, while the sham animals exhibited no preference regarding the use of a particular paw

Figure 2. Evaluation of brain damage after middle cerebral artery occlusion (MCA). (a) Representative TTC staining images of coronal sections 24 hours after MCA occlusion. The infarct area (in white) is mainly localized to cortical regions (scale bar represents 0.5 cm). (b) Regional distribution of the infarcted areas in coronal sections along the rostrocaudal axis as measured from bregma. (c) Evolution of the infarct volume across time after focal ischemia induced by MCA occlusion. The infarct volumes are represented as percentages of the total volume of the contralateral intact hemisphere. The data are shown as the means $\pm$ the standard error of the mean (SEM) of one experiment for each temporal point (24, 48, and 72 h) with a minimum of 5–7 mice for experiment. No significant differences were found in the volume of infarct across the time (one-way ANOVA test).

across time after the craniotomies (Figure 3(a) and (b)). In the ischemic mice, laterality was maximal one week after stroke and gradually recovered and returned to subnormal levels in the subsequent eight weeks

(Figure 3(b)). In the walking grid test, which allows for the discrimination of ischemic from control mice based on different levels of motor coordination and forepaw asymmetries, the percentage of footslips

Figure 3. Focal ischemia induced by distal MCA occlusion causes long-term functional deficits in mice. (a) Cylinder test. Use of the contralateral (left paw), ipsilateral (right paw), and both forelimbs in the cylinder test after MCA occlusion expressed as percentages of total paw contacts. (b) Asymmetry in forelimb use in the cylinder test was scored as $(\text{Right} - \text{Left}) / (\text{Right} + \text{Left} + \text{Both})$. Higher positive values of the laterality index indicate preferential use of the right, unaffected limb and therefore sensorimotor impairment. The empty bars represent the sham group, and the solid bars represent the ischemic mice. For the grid-walking test, (c) and (d) show the percentages of footslips for the left and right forepaws, respectively. The empty bars represent the sham group, and the solid bars represent the stroke mice. The data are shown as the means $\pm$ the SEM of two independent experiments with a minimum of 6–10 mice per group; sham or stroke; and temporal point. The asterisks denote significant differences between groups for each temporal point (two-way ANOVA followed by Tukey's test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

using the left forepaw (contralateral to the damaged hemisphere) was significantly higher and remained elevated at eight weeks in the stroke compared to the sham animals (Figure 3(c)). In the stroke group, the number of footslips with the right forepaw was initially reduced at one week and slowly returned to the basal values; in the sham animals, the right footslips did not vary with time in this study (Figure 3(d)).

Contralateral and ipsilateral EPs

The activity of the somatosensory cortex, including the forepaw representation area, was examined with SSEPs

that were firstly recorded at baseline (two weeks after the implantation of the electrodes). In response to electrical stimulation in each forepaw, several components were present in the respective contralateral hemisphere, but a large negative wave (N1) was particularly obvious (Figure 4(a), left traces). This prominent wave reached its maximal amplitude (peak) 20 ms after the constant-current stimulus and likely reflected the activities of different cell populations in the somatosensory cortex.¹⁶ We analyzed the evolution of this somatosensory response (N1 peak) across eight weeks post-infarction and relative to the baseline condition. The sham mice exhibited similar potential amplitudes in

Figure 4. Somatosensory evoked potentials (SSEPs) were impaired after distal MCA occlusion. (a) Examples SSEPs recorded from the left and right cortices in response to contralateral forepaw stimulation. The temporal evolution of the EP amplitudes in the sham (panel i) and ischemic mice (panel ii & iii) in the baseline condition and two, four, and six weeks after surgery are shown. The black and (continued)

both hemispheres in response to contralateral stimulation both at baseline and after craniotomies (Figure 4(a), traces in panel i, and Figure 4(c)). In the ischemic mice, the response of the damaged hemisphere to contralateral stimulation involved a prolonged and marked reduction of the N1 peak amplitude (Figure 4(a); black traces in panel ii and Figure 4(b); solid circles) compared to the corresponding contralateral response in the healthy hemisphere, which exhibited a progressive and substantially greater response compared to the baseline condition (Figure 4(a); blue lines in panels ii and Figure 4(b); empty circles). The majority of the infarcted mice exhibited a complete abolition of the EPs in the injured hemisphere that was irreversible across time (Figure 4(a), black traces in panel ii). Exceptionally, 2 of 15 mice ($N=3$ experiments) exhibited a progressively increasing response that reached amplitude values that were still considerably below those recorded in the baseline condition (Figure 4(a), black traces in panel iii), responses that were associated

with progressive better performance in both behavioral tests (data do not shown). Interestingly, in the ischemic mice, a positive correlation was found between the amplitudes of SSEPs in the intact and infarcted hemispheres (Pearson correlation; $r=0.52$, $p<0.01$). In summary, after infarction and in response to contralateral stimulation, a progressive increment in the N1 peak amplitude was observed in the intact hemisphere, and a marked amplitude reduction was detected in the damaged hemisphere (Figure 4(b)); in the sham animals, the amplitudes of the responses to contralateral stimulation were similar between hemispheres and no significant changes were observed with the post-craniotomy time (Figure 4(c)). These results were translated into ratios ($SSEP^{\text{damaged}}/SSEP^{\text{intact}}$) close to 100% in the sham animals; i.e. the values of the N1 peak amplitudes were similar among hemispheres, and substantial reductions in these ratios were observed in the group of ischemic animals (Figure 5(a)). The reduction in the N1 peak with post-ischemia time was

Figure 5. Analysis of somatosensory responses after contralateral stimulation in mice with cortical infarctions. (a) Ratio of the contralateral responses in the sham (empty circles) and stroke (solid circles) mice across time post-surgery. The ratios are expressed as EP amplitude in the damaged hemisphere with respect the normal hemisphere ($SSEP^{\text{damaged}}/SSEP^{\text{intact}}$). (b) The latencies of the N1 peaks in response to contralateral stimulation across time in the sham (empty circles) and infarcted (solid circles) mice. The solid and dashed lines represent the latencies for the operated and non-operated hemispheres, respectively. The data are shown as the means $\pm$ the SEM of three independent experiments with a minimum of 10–15 mice per group; sham or stroke; and temporal point. For every group, the asterisks denote significant differences with respect the corresponding baseline values (two-way ANOVA followed by Tukey's test; $**p < 0.01$).

Figure 4. (continued)

blue lines represent records from the affected and intact hemispheres, respectively. Normalized EP response amplitudes (N1 voltage peak) after contralateral stimulation of the infarcted (b) and sham mice (c) across time post-surgery. The blue and black lines represent values from the intact and affected hemispheres, respectively. The data are shown as the means $\pm$ the SEM of three independent experiments with a minimum of 10–15 mice per group; sham or stroke; and temporal point. The asterisks denote significant differences with respect the corresponding baseline values (two-way ANOVA followed by Tukey's test; $*p < 0.05$).

not accompanied by changes in the latency relative to the pre-ischemic condition (the latency values were calculated from the amplitude peaks $> 10 \mu\text{V}$; Figure 5(b)). To examine the relationship between the sensorimotor function evaluated by the cylinder and grid tests and the somatosensory cortical activity examined by SSEPs, we performed a Pearson correlation analysis including data from sham and stroke mice. The greater deficits in the two tests were associated with the lower ratios of SSEPs responses (Figure 6(a) and (b)). When this analysis was performed exclusively in the stroke group, we found a significant correlation only in the case of the grid test (grid test $r = -0.89$; $p < 0.01$, cylinder test $r = -0.39$; $p = 0.17$). In agreement with these results, the activity of the intact hemisphere was related with the degree of sensorimotor impairment, finding that the higher amplitudes of SSEPs responses correlated with the lower number of footslips of the affected paw in the grid test ($r = -0.55$, $p < 0.01$). These results support the sensitivity of the grid test to identify signs of sensorimotor deficits that were associated with significant changes of evoked activity in the somatosensory cortex of both hemispheres.

We also examined the field potentials in the infarcted and intact hemispheres in response to ipsilateral stimulation. The ipsilateral SSEPs exhibited a profile similar to that induced by the contralateral stimulation that included a negative component of somewhat smaller in amplitude and longer in latency (Table 1). In the sham mice, the ipsilateral EP amplitudes in both

hemispheres were similar and constant across time before and after the craniotomy (data not shown). By contrast, in the ischemic animals, the response to ipsilateral stimulation differed between hemispheres along the post-ischemia time (Figure 7(a)). The activities of the infarcted and intact hemispheres in response to ipsilateral stimulation were nearly absent one week after stroke; however, at later times (3–8 weeks) small but significant increases in activity, particularly in the infarcted hemisphere were observed (Figure 7(b)). Interestingly, in the ischemic mice, a positive correlation was found between the SSEPs amplitudes in the infarcted and intact hemispheres after ipsilateral and contralateral stimulation respectively ($r = 0.53$, $p < 0.01$).

Discussion

Our results show the existence of profound functional changes in the two hemispheres after unilateral cortical stroke induced by a dMCAO approach. In the cylinder and grid tests, the infarcted mice exhibited long-term deficits of varying degree, although some functional recovery was observed in the case of the cylinder test. A strong correlation was determined between the electrophysiological responses of the intact and infarcted somatosensory cortices and the degree of functional impairment.

In agreement with previous work, the resulting infarcts were small and localized to the sensorimotor

Figure 6. Sensorimotor functional deficits correlate with reduced activity in the somatosensory cortex. Pearson correlation analyses of the ratio values (SSEP response) obtained after contralateral forepaw stimulation and the scores in the cylinder (a) and grid-walking (b) tests. The laterality index and percentage of left forepaw footslips were the parameters from the respective tests that were used and are plotted against the ratio values (different symbols are used to unmask similar values). Equivalent numbers of mice from the sham and ischemic groups, at one, three, six, and eight weeks after the craniotomies were included in these analyses. The correlation values are shown at the top of each plot. Significant correlation values were observed in both functional tests but were particularly strong in the grid-walking test.

Table 1. Amplitudes and latencies of N1 wave of contralateral and ipsilateral SSEPs in sham mice.

	Contralateral stimulation		Ipsilateral stimulation	
	Amplitude (μ V)	Latency (ms)	Amplitude (μ V)	Latency (ms)
Right hemisphere	-65.09 ± 5.45 (**)	21.23 ± 1.20 (**)	-42.21 ± 6.01	27.65 ± 1.15
Left hemisphere	-70.59 ± 5.92 (**)	19.75 ± 0.42 (**)	-49.01 ± 6.21	28.53 ± 1.20

The data are shown as the means $\pm$ SEM of three independent experiments with a total of five sham mice per experiment. The asterisks denote significant differences in amplitudes and latencies between contralateral and ipsilateral responses (student's *t*-test; ***p* < 0.01). SSEPs: somatosensory evoked potentials.

cortical region, and brain swelling was not obvious.^{3,4,11} The infarct areas were consistently restricted to regions anterior to bregma and concentrated primarily in the somatosensory cortex in the barrel and forelimb receptive fields; the primary motor cortex was less affected. A similar regional distribution has previously been demonstrated in the mouse models of the distal occlusion by electrical coagulation.⁴

We have studied the short- and long-term effects of focal ischemia on sensorial and motor skills by combining functional tests and SSEPs. In the cylinder test, the laterality index in the ischemic mice was maximal at the first week after MCA occlusion and subsequently decreased over time towards values of sham mice, which was most likely associated with partial and slow recovery; however, this tendency did not reach statistical significance. Thus, in our hands, the cylinder test seemed to be appropriate for the examination of functional impairments as has been previously reported with this dMCAO model^{14,17} and in photothrombotic stroke models.^{9,13} In the foot-fault test, with respect to the sham group, we detect an increased percentage of slips in the paw contralateral to the infarcted hemisphere for at least eight weeks post-infarct, as has been previously reported in rats with cortical infarction over four weeks after surgery¹⁸ and more recently in mice over eight weeks in a cortical photothrombotic stroke model.¹³ In our study, the SSEPs of the infarcted hemisphere were essentially impaired in the majority of animals, and there was no statistical evidence of functional recovery; these observations might justify the existence of the persistent deficits in sensorimotor function exhibited in both tests, especially in the grid test. The stroke mice did not recover when they performed the grid test, but in the cylinder test, a trend of progressive recovery to a subnormal level was observed and might have been related to the fact that the cylinder test involves an easier task than that of the grid test for which most likely required greater sensory and motor coordination. Alternatively, the cylinder test might not discriminate between ischemic animals with different degree of sensorimotor impairment after the dMCAO approach.

Before ischemia, negative deflections (N1 wave) were detected in both hemispheres in response to forepaw contralateral stimulation. We believe that the N1 peak primarily represents the activity of the forepaw representation area in the pre-stroke condition, because this region is primarily activated 20 ms after contralateral forepaw stimulation.⁹ The main entrance of sensory information from the thalamus is the border of cortical layer Vb/VI, the granular layer IV and the lower part of layer III. In layer IV, axons of stellate cells and axon-collaterals of pyramidal cells distribute the somatosensory signals within cortical columns establishing synapses on the apical dendrites of pyramidal cells in the supragranular layers II/III and the infragranular layer Vb.¹⁹ In studies performed in rodents with epidural electrodes, it has been proposed that the N1 wave mostly reflects the activity of pyramidal cells in layer Vb resulting in depolarization of apical dendrites of supragranular layer II/III pyramidal cells.¹⁶ Similar to our results, nearly complete and durable abolitions of forelimb contralateral evoked potential responses in the infarcted hemisphere after cortical ischemia are well known and have been previously described in several species including humans.^{8,20} Imaging studies also support the absence of responses in the damaged hemisphere after contralateral stimulation.^{21,22} In our study, only 2 of 15 mice showed progressive increases of the responses in the infarcted hemisphere associated with possible functional recovery. At this point, it remains unclear to us whether these small potentials in the damaged hemisphere (Figure 4(a); panel iii) represent portions of residual activity within the forepaw cortical area⁸ or are associated with new activity in the peri-infarct tissue, specifically in portions of the motor area as has been previously reported at longer times after forepaw ischemia, when spontaneous functional recovery takes place.⁹

In the ischemic mice, progressively increasing amplitudes of responses were observed in the intact hemisphere after contralateral stimulation. In stroke patients and in rodents, an enhanced activity in the non-affected hemisphere has been described after contralateral stimulation of the non-affected

Figure 7. Potentials evoked by ipsilateral stimulation are impaired in mice after dMCAO. On the left side, cartoon showing the experimental setup with the position of electrodes for ipsilateral recordings in relation with the infarcted area (gray spot) and the stimulated forepaw. (a) Examples SSEPs recorded from both hemispheres after ipsilateral stimulation showing the temporal progression of the ipsilateral EP amplitude in the intact (panel i, gray line) and affected (panel ii, black line) hemispheres at baseline and at one and four weeks after dMCAO. Note that, after stroke, all responses in both hemispheres after ipsilateral stimulation were nearly completely abolished. (b) Normalized amplitude of the EP response (NI voltage peak) after ipsilateral stimulation in the infarcted mice across time post-ischemia. The empty and solid circles represent the values from the intact and damaged hemispheres, respectively. The data are shown as the means $\pm$ the SEM of three independent experiments with a minimum of 10–15 mice per temporal point. The asterisks denote significant differences between the hemispheres for each temporal point (two-way ANOVA followed by Tukey's test; * $p < 0.05$; # $p < 0.08$).

member,^{22–24} which has also been related to a larger motor response from the non-affected hand.^{25,26} This hyperexcitability in the intact hemisphere (diaschisis) has been commonly associated with better motor

recovery of the affected member after hemiparetic stroke.²⁷ The hyperexcitability in the intact hemisphere might be associated with a lack of inhibition between homologous regions of the somatosensory cortex

through the corpus callosum (CC).^{21,22} Whether this hyperexcitability has a positive or a negative effect on recovery is an actual point of debate.^{24,27,28} In our model of cortical infarction by MCAO, the increasing excitability in the intact hemisphere persisted for longer durations as has been observed in cortical stroke patients.

We also examined the ipsilateral activations of the somatosensory cortices in the intact and infarcted hemispheres. Ipsilateral activation is a mechanism that is poorly understood; it has been proposed that an ipsilateral potential can be generated by inter-hemispheric projections through the CC after contralateral hemisphere activation,²⁹ via direct projections of ascending non-decussating fibers to the ipsilateral hemisphere³⁰ or via volume conduction from the contralateral hemisphere.³¹ Several studies have demonstrated that the primary somatosensory cortex (S1) projects extensively at the border between S1 and the secondary somatosensory cortex in the opposite hemisphere.³² Callosal connections are probably required for integrating lateralized somatosensory input. In our study, in the pre-stroke condition, the short delay between the ipsilateral and contralateral potentials (~5–10 ms; table 1) was compatible with inter-hemispheric CC conduction.^{33,34} However, after stroke, the ipsilateral activation of the intact hemisphere was severely inhibited with respect to the pre-infarct condition. This effect was observed in the ischemic but not in the sham animals, which indicates that this reduced response was dependant on the changes in the infarcted hemisphere and might not be related to the direct projections of ascending uncrossed fibers from the affected paw. Thus, the reduced response in the intact hemisphere after ipsilateral stimulation might be related with the abolition of SSEPs potentials in the damaged hemisphere (contralateral stimulation). In a recent study in mice, no ipsilateral response was detected in the intact hemisphere after a distal MCAO approach.²³ By contrast, the ipsilateral potentials of the damaged hemisphere were also severely reduced after stroke. Although high evoked responses were detected in the intact hemisphere after contralateral stimulation, responses that were probably transmitted through the CC to the opposite hemisphere (damaged), a small conductivity of the extracellular medium or the destruction of a considerable number of cortical synapses, restricted to the infarcted region, might attenuate the amplitude of the ipsilateral potentials in the affected hemisphere. By contrast, transcallosal degeneration has been reported to occur in the cortex opposite to the lesion after stroke³⁵ and also might explain the reduction of these ipsilateral SSEPs. This initial and severe reduction of ipsilateral potentials in the damaged hemisphere were followed by a progressive and slight increase in the response at later time

points, which might be related with the phenomena of hyperexcitability that occurs in the intact hemisphere at longer times after ischemia. In this context, the results of the correlation analysis suggest a close relationship between the amplitudes of SSEPs responses generated in the intact and damaged hemispheres after contralateral and ipsilateral stimulation, respectively.

Several limitations of our study should be mentioned. First, housing the mice individually in cages might be related with the poor functional recovery that we have observed in our work, because social interaction in an enrichment environment have been shown to improve neurobehavioral function after stroke in rat models of photothrombosis³⁶ or ligation of the MCA.³⁷ The effects of enrichment environment on functional outcome can be explained by depression of the inflammatory response in the ischemic hemisphere, recovery of neuronal functions and connectivity, and post-ischemia brain plasticity. Second, to minimize the suffering of animals and to avoid movement artifacts, the electrophysiological recordings were performed under anesthesia with ketamine/xylazine. In humans, it is a common practice to monitor EPs in patients anesthetized during spinal cord surgery.³⁸ In monkeys and rats, the somatosensory cortex has been mapped under anesthesia with ketamine and many similarities to the awake state as well as certain differences have been reported.^{39,40} Although it is commonly accepted that different anesthetics as ketamine or urethane produce consistent alterations in the cerebral evoked response to forepaw stimulation, similar patterns of activation have been found for example in the sensorimotor cortex between urethane-anesthetized and awake mice.⁴¹ In addition, SSEPs have been performed in rodents under anesthesia to evaluate the effectiveness of different treatments or to examine the activity of the somatosensory cortex after ischemia.^{10,42,43} In our study, we chose ketamine/xylazine because it has been largely documented that volatile and barbiturate anesthetics including isoflurane depress and/or abolish EPs in humans and different species of animals including rodents.^{38,44} The electrophysiological recordings were started 10 min after ketamine/xylazine injection and we never used more than 10–15 min to complete a full recording session of contra and ipsi-lateral potentials; in this time frame, EP-amplitudes during deep anesthesia are relatively stable.⁴⁵ Although ketamine might modify the responsiveness of the cortex itself and the sensory message along the afferent pathway to the cerebral cortex, the same procedure was applied to all mice, and in these specific conditions, the SSEPs were mostly modified in the stroke mice while preserved in the sham animals. Another point that deserves consideration relates to the influence of ketamine in the performance of the behavioral tests. Ketamine produces profound

behavioral deficits, and this effect is mediated in part by the interruption of neurotransmission in different structures of the limbic system as the amygdala and hippocampus. At the same doses as used in the present study, the chronic daily administration of ketamine induces significant behavioral deficits, especially locomotor hyperactivity, that persisted several days after the withdrawal of the drug.⁴⁶ We always left 5 days between the application of a dose of ketamine/xylazine during the SSEPs recordings and the subsequent functional test the next week. Under this experimental paradigm, no significant fluctuations in the scores for both functional tests were observed over time in the group of sham mice, which suggests a reduced influence of the anesthesia in the performance of both behavioral tests across the study.

Although genetically modified mice are now becoming increasingly used, the employ of SSEPs recordings has been more restricted in this specie, particularly in this type of cortical infarction due to permanent distal MCAO. The small size of the animals might constitute a difficulty, but we have corroborated the feasibility of making long-term chronic recordings in the same animal using two separate surgeries. Our results demonstrate the reliability of SSEPs to examine functional outcome in mice with damage in the somatosensorial cortex, which is characteristic of this specific stroke model, widely used to mimic human ischemic stroke. The combined use of functional tests and SSEPs across time post-ischemia can serve to examine the effectiveness of neuroprotective drugs and the contributions of different genes in the evolution of cortical damage after stroke by using genetically modified mice, helping us identify new potential targets for medication development. We also have shown the usefulness of the SSEPs to examine phenomena of brain plasticity in the intact hemisphere after unilateral cortical stroke. In our study, the correlation analysis indicates that the hyperexcitability was mostly observed in the mice with less degree of impairment after the dMCAO approach. This hyperexcitability in the intact hemisphere and the partial recovery observed exceptionally in some mice might be linked with the phenomena of plasticity at the spinal cord level. After stroke, the recovery of skilled forelimb movements has been associated with the rewiring of midline-crossing corticospinal fibers from the intact hemisphere to the denervated side of the spinal cord in rats submitted to unilateral pyramidotomy,⁴⁷ and recently in a therapeutic model of stroke in rats using antibodies against anti neurite-growth-inhibitory protein (Nogo-A) and subsequent rehabilitative training.⁴⁸

Collectively, here we have identified the existence of long-term deficits in mice after cortical infarction induced by ligation of the distal part of the MCA. Sensorimotor skills were substantially affected in parallel with impairments in the somatosensory cortices of

the both the infarcted and non-infarcted hemispheres. Long-term examinations of somatosensory and motor cortical function enable the study of the mechanisms of plasticity in peri-infarct areas⁹ or, alternatively, the long-term reactivation of damaged representations.⁸ In the preclinical scenario, the sensitivity and reproducibility of SSEPs make them appropriate for a short- and long-term examination of cortical function after stroke and for the evaluation of the effectiveness of drugs in neuroprotection and cell-therapy-based neurorestoration approaches.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was supported by the Community of Madrid Grant Neurotec-S2010/BMD-2460 (to D.G.-N.), from Mexican National Committee of Science and Technology (CONACyT to L.P) and funds from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Consolider CSD2008-00005 and BFU2013-33821 to L.C.B.). We would like to thank Soledad Martinez for the excellent technical assistance. We also express our gratitude to Carlos Paino for his assistance with the histological images.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Authors' contributions

JB and LP contributed equally to this work. JB and D G-N designed the research; LP and JB performed the majority of the experiments with the help of L F-G, R M-M and D G-N; R M-M, LCB and MR provided crucial reagents; LP, JB and D G-N analyzed the data; JB and D G-N interpreted the results; JB, LCB, MR and R M-M helped write and revise the manuscript and D G-N wrote the paper.

Supplementary material

Supplementary material for this paper can be found at <http://jcbfm.sagepub.com/content/by/supplemental-data>

References

1. Lhermitte F, Gautier JC and Derouesne C. Nature of occlusions of the middle cerebral artery. *Neurology* 1970; 20: 82–88.
2. Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, et al. Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988; 8: 474–485.
3. Kuraoka M, Furuta T, Matsuwaki T, et al. Direct experimental occlusion of the distal middle cerebral artery induces high reproducibility of brain ischemia in mice. *Exp Anim* 2009; 58: 19–29.

4. Lubjuhn J, Gastens A, von Wilpert G, et al. Functional testing in a mouse stroke model induced by occlusion of the distal middle cerebral artery. *J Neurosci Methods* 2009; 184: 95–103.
5. Olsen TS. Arm and leg paresis as outcome predictors in stroke rehabilitation. *Stroke* 1990; 21: 247–251.
6. Sakatani K, Iizuka H and Young W. Somatosensory evoked potentials in rat cerebral cortex before and after middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1990; 21: 124–132.
7. Weaver M, Leshley K, Sands H, et al. LEX032, a novel recombinant serpin, protects the brain after transient focal ischemia. *Microvasc Res* 2002; 63: 327–334.
8. Ramos-Cabrera P, Justicia C, Wiedermann D, et al. Stem cell mediation of functional recovery after stroke in the rat. *PLoS One* 2010; 5: e12779.
9. Brown CE, Aminoltejeri K, Erb H, et al. In vivo voltage-sensitive dye imaging in adult mice reveals that somatosensory maps lost to stroke are replaced over weeks by new structural and functional circuits with prolonged modes of activation within both the peri-infarct zone and distant sites. *J Neurosci* 2009; 29: 1719–1734.
10. Takatsuru Y, Fukumoto D, Yoshitomo M, et al. Neuronal circuit remodeling in the contralateral cortical hemisphere during functional recovery from cerebral infarction. *J Neurosci* 2009; 29: 10081–10086.
11. Pozo-Rodríguez A, Gradillas A, Serrano J, et al. New synthesis and promising neuroprotective role in experimental ischemic stroke of ONO-1714. *Eur J Med Chem* 2012; 54: 439–446.
12. Isayama K, Pitts LH and Nishimura MC. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining to delineate rat brain infarcts. *Stroke* 1991; 22: 1394–1398.
13. Clarkson AN, Lopez-Valdes HE, Overman JJ, et al. Multimodal examination of structural and functional remapping in the mouse photothrombotic stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; 33: 716–723.
14. Jin K, Mao X, Xie L, et al. Transplantation of human neural precursor cells in Matrigel scaffolding improves outcome from focal cerebral ischemia after delayed post-ischemic treatment in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30: 534–544.
15. Hernandez TD and Schallert T. Seizures and recovery from experimental brain damage. *Exp Neurol* 1988; 102: 318–324.
16. Jellema T, Brunia CH and Wadman WJ. Sequential activation of microcircuits underlying somatosensory-evoked potentials in rat neocortex. *Neuroscience* 2004; 129: 283–295.
17. Roof RL, Schielke GP, Ren X, et al. A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. *Stroke* 2001; 32: 2648–2657.
18. Stroemer RP, Kent TA and Hulsebosch CE. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke* 1995; 26: 2135–2144.
19. Castro-Alamancos MA and Connors BW. Thalamocortical synapses. *Prog Neurobiol* 1997; 51: 581–606.
20. Weber R, Ramos-Cabrera P, Justicia C, et al. Early prediction of functional recovery after experimental stroke: functional magnetic resonance imaging, electrophysiology, and behavioral testing in rats. *J Neurosci* 2008; 28: 1022–1029.
21. Dijkhuizen RM, Ren J, Mandeville JB, et al. Functional magnetic resonance imaging of reorganization in rat brain after stroke. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12766–12771.
22. Mohajerani MH, Aminoltejeri K and Murphy TH. Targeted mini-strokes produce changes in interhemispheric sensory signal processing that are indicative of disinhibition within minutes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: E183–E191.
23. Johnston DG, Denizet M, Mostany R, et al. Chronic in vivo imaging shows no evidence of dendritic plasticity or functional remapping in the contralesional cortex after stroke. *Cereb Cortex* 2013; 23: 751–762.
24. Nakashima K, Kanba M, Fujimoto K, et al. Somatosensory evoked potentials over the non-affected hemisphere in patients with unilateral cerebrovascular lesions. *J Neurol Sci* 1985; 70: 117–127.
25. Liepert J, Hamzei F and Weiller C. Motor cortex disinhibition of the unaffected hemisphere after acute stroke. *Muscle Nerve* 2000; 23: 1761–1763.
26. Traversa R, Cicinelli P, Pasqualetti P, et al. Follow-up of interhemispheric differences of motor evoked potentials from the ‘affected’ and ‘unaffected’ hemispheres in human stroke. *Brain Res* 1998; 803: 1–8.
27. Schaechter JD and Perdue KL. Enhanced cortical activation in the contralesional hemisphere of chronic stroke patients in response to motor skill challenge. *Cereb Cortex* 2008; 18: 638–647.
28. Ward NS, Brown MM, Thompson AJ, et al. Neural correlates of outcome after stroke: a cross-sectional fMRI study. *Brain* 2003; 126(Pt 6): 1430–1448.
29. Allison T, McCarthy G, Wood CC, et al. Human cortical potentials evoked by stimulation of the median nerve. II. Cytoarchitectonic areas generating long-latency activity. *J Neurophysiol* 1989; 62: 711–722.
30. Kanno A, Nakasato N, Hatanaka K, et al. Ipsilateral area 3b responses to median nerve somatosensory stimulation. *Neuroimage* 2003; 18: 169–177.
31. Kakigi R. Ipsilateral and contralateral SEP components following median nerve stimulation: effects of interfering stimuli applied to the contralateral hand. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1986; 64: 246–259.
32. Henry EC and Catania KC. Cortical, callosal, and thalamic connections from primary somatosensory cortex in the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*), with special emphasis on the connectivity of the incisor representation. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2006; 288: 626–645.
33. Caminiti R, Carducci F, Piervincenzi C, et al. Diameter, length, speed, and conduction delay of callosal axons in macaque monkeys and humans: comparing data from histology and magnetic resonance imaging diffusion tractography. *J Neurosci* 2013; 33: 14501–14511.

34. Wang SS, Shultz JR, Burish MJ, et al. Functional trade-offs in white matter axonal scaling. *J Neurosci* 2008; 28: 4047–4056.
35. Adkins DL, Voorhies AC and Jones TA. Behavioral and neuroplastic effects of focal endothelin-1 induced sensorimotor cortex lesions. *Neuroscience* 2004; 128: 473–486.
36. Madinier A, Quattromani MJ, Sjolund C, et al. Enriched housing enhances recovery of limb placement ability and reduces aggrecan-containing perineuronal nets in the rat somatosensory cortex after experimental stroke. *PLoS One* 2014; 9: e93121.
37. Ohlsson AL and Johansson BB. Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats. *Stroke* 1995; 26: 644–649.
38. Sloan TB and Heyer EJ. Anesthesia for intraoperative neurophysiologic monitoring of the spinal cord. *J Clin Neurophysiol* 2002; 19: 430–443.
39. Patel IM and Chapin JK. Ketamine effects on somatosensory cortical single neurons and on behavior in rats. *Anesth Analg* 1990; 70: 635–644.
40. Stryker MP, Jenkins WM and Merzenich MM. Anesthetic state does not affect the map of the hand representation within area 3b somatosensory cortex in owl monkey. *J Comp Neurol* 1987; 258: 297–303.
41. Ferezou I, Haiss F, Gentet LJ, et al. Spatiotemporal dynamics of cortical sensorimotor integration in behaving mice. *Neuron* 2007; 56: 907–923.
42. Bordi F, Pietra C, Ziviani L, et al. The glycine antagonist GV150526 protects somatosensory evoked potentials and reduces the infarct area in the MCAo model of focal ischemia in the rat. *Exp Neurol* 1997; 145(2 Pt 1): 425–433.
43. Zhao LR, Berra HH, Duan WM, et al. Beneficial effects of hematopoietic growth factor therapy in chronic ischemic stroke in rats. *Stroke* 2007; 38: 2804–2811.
44. Hayton SM, Kriss A and Muller DP. Comparison of the effects of four anaesthetic agents on somatosensory evoked potentials in the rat. *Lab Anim* 1999; 33: 243–251.
45. Zandieh S, Hopf R, Redl H, et al. The effect of ketamine/xylazine anesthesia on sensory and motor evoked potentials in the rat. *Spinal Cord* 2003; 41: 16–22.
46. Chatterjee M, Ganguly S, Srivastava M, et al. Effect of ‘chronic’ versus ‘acute’ ketamine administration and its ‘withdrawal’ effect on behavioural alterations in mice: implications for experimental psychosis. *Behav Brain Res* 2011; 216: 247–254.
47. Starkey ML, Bleul C, Maier IC, et al. Rehabilitative training following unilateral pyramidotomy in adult rats improves forelimb function in a non-task-specific way. *Exp Neurol* 2011; 232: 81–89.
48. Wahl AS, Omlor W, Rubio JC, et al. Neuronal repair. Asynchronous therapy restores motor control by rewiring of the rat corticospinal tract after stroke. *Science* 2014; 344: 1250–1255.