



**REPARACIÓ PRENATAL DEL MIELOMENINGOCELE
MITJANÇANT CÈL·LULES MESENQUIMALS
ESTROMALS DE LÍQUID AMNIÒTIC
EN MODEL OVÍ**

Memòria per optar al grau de
Doctora en Biotecnologia

MARGARITA CODINACH CREUS

2015



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA

**REPARACIÓ PRENATAL DEL MIELOMENINGOCELE
MITJANÇANT CÈL·LULES MESENQUIMALS ESTROMALS
DE LÍQUID AMNIÒTIC EN MODEL OVÍ**

MARGARITA CODINACH I CREUS

TESI DOCTORAL

Programa de doctorat en Biotecnologia

Departament d'Enginyeria Química

Directors: Dr. César G. García Fontecha i Dr. Joaquim Vives Armengol

Tutor: Dr. Francesc Gòdia i Casablanca

Bellaterra, Setembre de 2015

CESAR G. GARCÍA FONTECHA, Facultatiu especialista de Traumatologia de l'Hospital Vall d'Hebron, i **JOAQUIM VIVES ARMENGOL**, Facultatiu del Banc de sang i Teixits

CERTIFIQUEM: Que la llicenciada **MARGARITA CODINACH CREUS** ha dut a terme amb la nostra direcció, en els laboratoris del Banc de Sang i Teixits a l'Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron, el treball que amb el títol: Reparació prenatal del Mielomeningocele mitjançant cèl·lules mesenquimals estromals de líquid amniòtic en model oví, es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al grau de Doctora en Biotecnologia.

I perquè en prengueu coneixement i tingui els efectes que correspongui, presentem davant de l'Escola de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi signant amb aquesta certificació a

Bellaterra, Setembre 2015

César G. García Fontecha

Joaquim Vives Armengol

Tot està per fer i tot és possible
Miquel Martí i Pol.

AGRAÏMENTS

Suposo que si estic escrivint aquestes paraules és perquè estem arribant a la fase final del projecte. Un projecte que es va iniciar el 2008 amb molta il·lusió per part meva, ja que havia de representar la base del meu desenvolupament professional al Banc de Sang i Teixits (BST). Per motius que ara no vénen al cas, passat un temps, va esdevenir el meu *hobby* preferit. Amb la mateixa il·lusió, perseverança, i pensant sempre amb les famílies amb nens amb espina bífida, hi he dedicat les tardes, nits i caps de setmana durant els últims 7 anys. Ha estat un camí llarg i em sento molt afortunada, perquè he comptat amb l'ajuda de moltes persones, sense les quals tirar endavant hagués estat impossible. I us vull donar les gràcies de tot cor:

En primer lloc, al César per la confiança absoluta que has demostrat en mi des de que vam iniciar aquest projecte, per transmetre'm la passió per la recerca d'un tractament millor per l'espina bífida, per trobar sempre un foradet per dedicar-me i per recordar-me sempre què és l'important en els moments de debilitat.

Quim, gràcies per aquesta dosi d'energia positiva i creativitat groga que tan admiro i també pels teus coneixements d'alta qualitat en la matèria i que has aportat al projecte.

Luciano, pel rigor i grau d'exigència que m'has demanat en tot el què he fet, les moltes hores davant del citòmetre i per les decisions correctes preses des de 2008 i que m'han permès arribar avui aquí.

A en Joan Garcia, per donar-me l'oportunitat d'entrar en el món meravellós de la medicina regenerativa. A la Carmen Azqueta i a les meves companyes "mai mai" de Banc de Cordó, per ser el meu referent al BST i per ensenyar-me el que és ser una bona professional... A la Núria, la meva gran amiga, per la teva paciència infinita, per tot el què hem après treballant com un autèntic equip (entre taurons), pels moments "cèlia mesenquimal", i perquè no acceptarem més pastanagues!! A la Marga, per ser una companya extraordinària de batalla dia rere dia a Xcelia, i, tot i els moments difícils, apa que no disfrutem treballant juntes! I a les meves "nenes" i "nen" d'Operacions: Mireia, Isa, Laura, Silvia, Maribel i Doral, per fer-me créixer professionalment cada dia i ensenyar-me a treballar amb alegria. Míriam, pel teu esperit de lluita i per ajudar-me a fer que aquest treball també sigui bonic!

Jordi Barquinero, Ramon Gimeno i Fran Garcia, gràcies per fer-me un lloc al vostre laboratori i ajudar-me en tot el que ha estat al vostre abast. I a la Herena, la Irene, el Luis, la Raquel, la Sonia, l'Alba, la Melanie, el Sergio, la Silvia per fer-me sentir sempre com a una més del grup, encara que els meus horaris hagin pogut

distorsionar la vostra feina. Sergio, mil gràcies per la teva predisposició i ajuda indispensable en la transducció.

Marielle i Carla, gràcies per cuidar-me les ovelletes sempre amb aquesta passió!

A la Marta Valeri, per la teva amabilitat, pels teus consells sempre imprescindibles i per les converses sobre els nostres viatges i experiències durant les llargues adquisicions del microscopi de fluorescència.

Cleo per actuar, sense ser-ho, com si fossis la meva directora de tesi durant molt temps. Tot el que sé d'anatomia patològica ho he après amb tu! I per totes les hores i més hores que m'has dedicat revisant les laminetes de les ovelletes... I a la Teresa, per rebre les meves peticions sempre urgents amb tanta predisposició i amb aquell somriure.

A la Silvia Lope, gracias por adaptarte siempre a mis horarios locos, por tus clases en RMN y ayudarme siempre que has podido aunque sea en la distancia.

A la meva colla de Torelló: Olga i Alfredo, Xua i Elena, Alex, Kuliki, Jordi Dede, Laura i Alex, Will i Nus, Ury i Maria, Colo i Meri, Xevi i Montseta, Miguel, Jose, Barni, i Nino, per la barra del Big Bag, pels caps d'any interpretant, per l'emoció i il·lusió dels casaments sorpresa, per donar-me aquesta alenada d'aire fresc sempre que ens trobem i fer-me tornar als meus orígens que tant estimo! Olga, gràcies per demostrar-me cada dia què significa la paraula amistat.

Cate, Queralt, Lidia, Gabri, Marta Leg, Marta Homs, Marta Diez i Clo: per Kike's i Terol, pels vinets, els viatges de nenes, les "risas" i tots els moments especials que hem viscuts els darrers anys. Estic emocionadíssima!!

A la meva família i, en especial, a la meva mare i al meu pare, perquè us estimo amb bogeria i per ensenyar-me què és la bondat, la responsabilitat i la cultura de l'esforç. A la meva germaneta Eli, la meva confident, per no fer falta haver de dir res, i per ser moltes vegades l'única persona que ha comprès els disbarats que he fet per tirar endavant aquest projecte. Alícia, gràcies per ser-hi sempre, per les infinites converses sobre la vida, per les nostres aventures que sempre acaben bé, i, evidentment, pel teu especial toc de qualitat final en la memòria d'aquest treball.

Finalment, i molt especialment, a en Ricardo, per estimar-me i cuidar-me com una autèntica princesa des del dia que ens vam conèixer, i per fer-me cada dia millor persona.

RESUM DE LA TESI DOCTORAL

Aquest treball de tesi doctoral s'emmarca en un camp de recerca dins la medicina regenerativa, l'objectiu del qual és la reparació prenatal del Mielomeningocele (MMC), que és la forma més comú i severa d'espina bífida. Aquesta malaltia congènita es caracteritza per un defecte en el tancament de la part posterior del tub neural durant el període embrionari, quedant la medul·la espinal i les seves arrels nervioses exposades al medi uterí. En conseqüència, el teixit neural pateix un deteriorament anatòmic i funcional progressiu sever, acompanyat d'una pèrdua de líquid cefaloraquídi per la zona del defecte, que dóna lloc al desenvolupament de la malformació de Chiari II i hidrocefàlia.

Les tècniques utilitzades actualment en clínica han permès dur a terme cirurgies fetals amb l'objectiu de cobrir o reparar el defecte. D'aquesta manera s'aconsegueix frenar el deteriorament del teixit neural, revertir la malformació de Chiari i reduir la necessitat de derivacions ventriculo-peritoneals per tractar l'hidrocefàlia. Tot i la millora en l'estat neurocognitiu, motor i urinari, es requereixen cirurgies correctores per l'aparició de deformitats esquelètiques sobretot durant la infantesa. La manca d'estructures òssies a la part posterior de les vertebres on fixar els sistemes metàl·lics d'estabilització espinal, dificulta enormement aquestes cirurgies.

En la tesi que aquí es presenta s'ha treballat en el desenvolupament d'un producte d'enginyeria tissular, basat en cèl·lules mesenquimals estromals autòlogues aïllades de líquid amniòtic (AF-oMSCs), en combinació amb diferents tipus de matrius biocompatibles en un model experimental oví de MMC induït quirúrgicament.

El producte cel·lular s'ha generat a partir de mostres de líquid amniòtic, obtingudes en el moment de la cirurgia d'inducció del MMC, que s'han cultivat durant les aproximadament tres setmanes que la separen de la cirurgia de reparació. S'han caracteritzat els paràmetres cinètics, fenotípics i funcionals de les AF-oMSCs aïllades i expandides *ex vivo*. Així mateix, s'han posat al punt metodologies pel marcatge i seguiment cel·lular utilitzant micropartícules d'òxid de ferro (MPIOs) i la transducció amb partícules virals que codifiquen per la proteïna verda fluorescent (eGFP).

S'han avaluat tres tipus de biomatrius compostes d'àcid polilàctic-co-glicòlic (PLGA), fibrina i matriu òssia desmineralitzada (DBM). Els resultats d'aquest projecte demostren la possibilitat de generar, a partir dels constructes compostos per una barreja d'AF-oMSCs, DBM i Fibrina, una estructura òssia similar a un arc vertebral posterior amb moll d'os a l'interior, ben integrat anatòmicament i rodejat per teixit connectiu, teixit adipós i recobert per pell.

TAULA DE CONTINGUTS

CAPÍTOL 1: INTRODUCCIÓ	25
1.1. EL MIELOMENINGOCELE.....	27
1.2. APROXIMACIONS TERAPÈUTIQUES ACTUALS DEL MMC	30
1.2.1. REPARACIÓ POSTNATAL DEL MMC	30
1.2.2. ESTUDIS EN MODELS ANIMALS	31
1.2.3. REPARACIÓ PRENATAL DEL MMC	32
1.2.4. ASPECTES NO RESOLTS	34
1.3. TEIXIT OSSI	34
1.3.1. FUNCIÓ I ESTRUCTURA DEL TEIXIT OSSI	34
1.3.2. OSTEOGÈNESI	37
1.3.3. COMPOSICIÓ DEL TEIXIT DIANA QUE ES PRETÉN REGENERAR.....	38
1.4. L'ENGINYERIA TISSULAR COM A APROXIMACIÓ TERAPÈUTICA DEL MMC...	40
1.4.1. CÈL·LULES	41
1.4.2. BIOMATRIUS.....	42
1.4.3. FACTORS DE SENYALITZACIÓ	43
1.5. ENGINYERIA TISSULAR PEL TRACTAMENT FETAL DEL MMC.....	43
CAPÍTOL 2: OBJECTIUS	45
2.1. OBJECTIU GENERAL	47
2.2. OBJECTIUS ESPECÍFICS.....	47
CAPÍTOL 3: AÏLLAMENT, EXPANSIÓ I CARACTERITZACIÓ DE CÈL·LULES MESENQUIMALS ESTROMALS DE LÍQUID AMNIÒTIC OVÍ	49
3.1. INTRODUCCIÓ.....	51
3.2. RESULTATS	54
3.2.1. AÏLLAMENT DE LES AF-oMSCs.....	54
3.2.2. OPTIMITZACIÓ DE LES CONDICIONS DE CULTIU PER A LES AF-oMSCs ..	59
3.2.3. ASSAIG D'UNITATS FORMADORES DE COLÒNIES FIBROBLÀSTIQUES.....	63
3.2.4. CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DE LES AF-oMSCs.....	64
3.2.5. CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE LES AF-oMSCs	65
3.2.6. PRODUCCIÓ DE AF-oMSCs A DOSI CLÍNICA	67

3.3.	DISCUSSIÓ DE RESULTATS I CONCLUSIONS	69
CAPÍTOL 4: MARCATGE I SEGUIMENT DE LES AF-oMSCs MITJANÇANT MICROPARTÍCULES D'ÒXID DE FERRO		
4.1.	INTRODUCCIÓ	75
4.2.	RESULTATS	77
4.2.1.	DEFINICIÓ INICIAL DEL PROTOCOL MARCATGE DE AF-oMSCs AMB MPIOs 77	
4.2.2.	ESTUDI DEL PATRÓ DE CREIXEMENT DE LES AF-oMSCs MARCADES	80
4.2.3.	ESTABILITAT DE LES MPIOs EN LES AF-oMSCs EN CULTIU.....	81
4.2.4.	ESTUDI DE SENESCÈNCIA DE LES CÈL·LULES MARCADES	82
4.2.5.	EFFECTE DE LA DENSITAT CEL·LULAR EN CULTIU EN EL MARCATGE.....	83
4.2.6.	DETECCIÓ DEL MARCATGE AMB MPIOs MITJANÇANT RESSONÀNCIA MAGNÈTICA	84
4.3.	DISCUSSIÓ DE RESULTATS I CONCLUSIONS	90
CAPÍTOL 5: REPARACIÓ PRENATAL DEL MMC UTILITZANT BIOMATRIUS D'ÀCID POLILÀCTIC-CO-GLICÒLIC COLONITZADES AMB AF-oMSCs		
5.1.	INTRODUCCIÓ	93
5.2.	RESULTATS	95
5.2.1.	FABRICACIÓ DE LES BIOMATRIUS DE PLGA	95
5.2.2.	COLONITZACIÓ DE LES BIOMATRIUS DE PLGA AMB AF-oMSCs <i>IN VITRO</i>	95
5.2.3.	OPTIMITZACIÓ DE LA COLONITZACIÓ EN SISTEMA AGITAT UTILITZANT L'EQUIP MACSMIX	97
5.2.4.	REPARACIÓ DEL MMC AMB BIOMATRIUS DE PLGA COLONITZADES AMB AF- oMSCs 106	
5.2.5.	AVALUACIÓ DEL FETUS OVINS TRACTATS	111
5.2.6.	DETECCIÓ DE LES AF-oMSCs MARCADES AMB MPIOs <i>EX VIVO</i>	115
5.3.	DISCUSSIÓ DE RESULTATS I CONCLUSIONS	118
CAPÍTOL 6: REPARACIÓ PRENATAL DEL MMC UTILITZANT BIOMATRIUS DE FIBRINA I AF-oMSCs		
6.1.	INTRODUCCIÓ	123
6.2.	RESULTATS	126
6.2.1.	PREPARACIÓ DEL CONSTRUCTE DE FIBRINA.....	126

6.2.2.	ESTABILITAT DE LES AF-oMSCS EN EL CONSTRUCTE DE FIBRINA	127
6.2.3.	APLICACIÓ DE LES BIOMATRIUS DE FIBRINA I AF-OMSCS EN EL MODEL OVÍ DE MMC	129
6.2.4.	AVALUACIÓ DELS FETUS OVINS TRACTATS	133
6.3.	DISCUSSIÓ DE RESULTATS I CONCLUSIONS	144
CAPÍTOL 7: REPARACIÓ PRENATAL DEL MMC UTILITZANT MATRIU ÒSSIA DESMINERALITZADA, FIBRINA I AF-oMSCs.....		147
7.1.	INTRODUCCIÓ	149
7.2.	RESULTATS	151
7.2.1.	FABRICACIÓ DELS CONSTRUCTES AMB MATRIU ÒSSIA DESMINERALITZADA I FIBRINA.....	151
7.2.2.	ESTABILITAT DE LES AF-oMSCs EN EL CONSTRUCTE DE FIBRINA	151
7.2.3.	TRIPLE REPARACIÓ DEL MMC AMB CONSTRUCTES DE DBM, FIBRINA I AF-oMSCs	152
7.2.4.	REPARACIÓ DEL MMC AMB CONTRUCTES DE DBM, FIBRINA I AF-oMSCs	159
7.3.	DISCUSSIÓ DE RESULTATS I CONCLUSIONS	169
7.4.	TREBALL FUTUR	171
CAPÍTOL 8: CONCLUSIONS		173
CAPÍTOL 9: MATERIALS I MÈTODES		177
9.1.	CIRURGIA D'INDUCCIÓ DEL MIELOMENINGOCELE	179
9.2.	RECOLLIDA DEL LÍQUID AMNIÒTIC OVÍ	181
9.3.	AÏLLAMENT DE CÈL·LULES MESENQUIMALS ESTROMALS DE LÍQUID AMNIÒTIC	182
9.4.	EXPANSIÓ DE LES AF-oMSCs	182
9.5.	EXPANSIÓ DE AF-oMSCs PER OBTENCIÓ DE LA DOSI CLÍNICA.....	184
9.6.	CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA PER CITOMETRIA DE FLUX.....	184
9.7.	CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE LES AF-oMSCs	186
9.7.1.	DIFERENCIACIÓ OSTEOGÈNICA.....	187
9.7.2.	DIFERENCIACIÓ CONDROGÈNICA.....	187
9.7.3.	DIFERENCIACIÓ ADIPOGÈNICA	187
9.8.	ASSAIG D'UNITATS FORMADORES DE COLÒNIES FIBROBLÀSTIQUES	188

9.9.	MARCATGE AMB MICROPARTÍCULES D'ÒXID DE FERRO	188
9.9.1.	DEFINICIÓ INICIAL DEL PROTOCOL MARCATGE DE AF- α MSCS AMB MPIOs 189	
9.9.2.	ESTUDI DEL PATRÓ DE CREIXEMENT DE LES AF- α MSCS MARCADES	190
9.9.3.	ESTABILITAT DE LES MPIOs EN LES AF- α MSCS EN CULTIU.....	191
9.9.4.	ESTUDI DE SENESCÈNCIA DE LES CÈL·LULES MARCADES	191
9.9.5.	EFFECTE DE LA DENSITAT CEL·LULAR EN CULTIU EN EL MARCATGE.....	192
9.9.6.	DETECCIÓ DEL MARCATGE AMB MPIOs MITJANÇANT RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR.....	192
9.9.7.	DETECCIÓ DEL MARCATGE AMB MPIOs MITJANÇANT TINCIÓ DE PERL'S	197
9.10.	MARCATGE I SEGUIMENT DE LES AF- α MSCs AMB PROTEÏNA VERDA FLUORESCENT	197
9.10.1.	TRANSDUCCIÓ DE LES AF- α MSCS.....	198
9.10.2.	DETECCIÓ DE LES AF- α MSCS MARCADES AMB eGFP PER CITOMETRIA DE FLUX 200	
9.10.3.	DETECCIÓ AF- α MSCS MARCADES AMB eGFP <i>EX VIVO</i>	201
9.11.	COLONITZACIÓ DE BIOMATRIUS PLGA AMB AF- α MSCs	201
9.11.1.	MANUFACTURA DE LES BIOMATRIUS	201
9.11.2.	COLONITZACIÓ DE LES BIOMATRIUS AMB AF- α MSCS	202
9.11.3.	ESTUDIS PER MICROSCÒPIA CONFOCAL DE FLUORESCÈNCIA	204
9.11.4.	ESTUDIS PER MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA	206
9.12.	PREPARACIÓ DE LES BIOMATRIUS DE FIBRINA.....	207
9.12.1.	OBTENCIÓ DE PLASMA POBRE EN PLAQUETES A PARTIR DE SANG PERIFÈRICA D'OVELLA	207
9.12.2.	PREPARACIÓ DEL CONSTRUCTE AMB AF- α MSCS.....	208
9.12.3.	ESTUDI D'ESTABILITAT DE LES AF- α MSCS EN FIBRINA	208
9.13.	PREPARACIÓ DELS CONSTRUCTES AMB MARIU ÒSSIA DESMINERALITZADA I FIBRINA.....	210
9.14.	CIRURGIA DE REPARACIÓ DEL MMC	212
9.14.1.	EXPOSICIÓ DE LA ZONA AMB MMC	212
9.14.2.	REPARACIÓ DEL MMC.....	213

9.15.	RECUPERACIÓ I SEGUIMENT DELS NOUNATS OVINS	215
9.15.1.	RECUPERACIÓ DEL NOUNAT OVÍ	215
9.15.2.	ESTUDI CLÍNIC DEL NOUNAT OVÍ	215
9.15.3.	ESTUDI POSTCLÍNIC DEL NOUNAT OVÍ	216
9.15.4.	CRITERIS DE PUNT FINAL	216
9.16.	ESTUDIS HISTOLÒGICS	216
9.16.1.	TINCIONS HISTOLÒGIQUES	217
9.16.2.	TÈCNIQUES D'IMMUNOHISTOQUÍMICA	223
9.16.3.	AVALUACIÓ DE LA REGENERACIÓ DE L'ARC VERTEBRAL POSTERIOR	227
9.17.	ANÀLISIS ESTADÍSTICS	227
CAPÍTOL 10: BIBLIOGRAFIA		229
ANNEX: SIGLES I ACRÒNIMS		241



CAPÍTOL 1: INTRODUCCIÓ

(Font imatge portada Capítol 1: <http://childrens.memorialhermann.org/patient-stories/double-the-birthday-celebrations-for-spina-bifida-patient/>).

1.1. EL MIELOMENINGOCELE

L'espina bífida és una malformació congènita que afecta el sistema nerviós central i que es produeix per un dèficit de tancament de la part posterior del tub neural durant el desenvolupament embrionari i, més concretament, durant la tercera setmana de gestació, provocant l'exposició del teixit neural al medi uterí (Figura 1.1.).

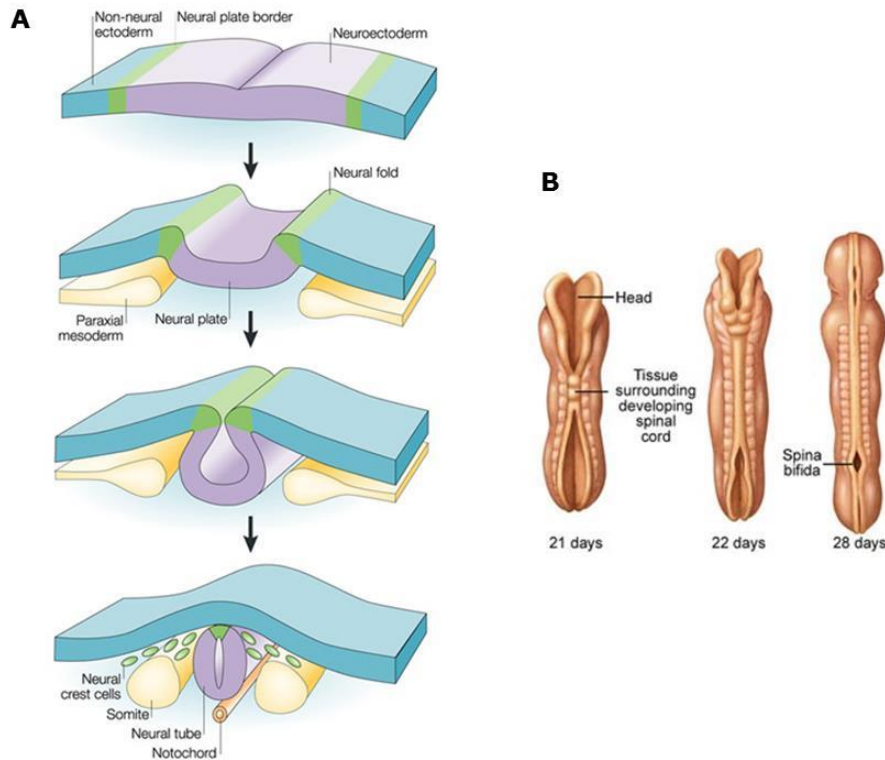


Figura 1.1. Desenvolupament del tub neural o Neurulació: A) Els extrems laterals de la placa neural s'eleven i donen lloc als plects neurals i la porció mitja deprimida esdevé el solc neural. Poc a poc, els plects neurals s'aproximen un a l'altre cap a la línia mitjana on es fusionen. La fusió dels plects neurals s'inicia en diversos punts i avança cranial i caudalment. El resultat és la formació del **tub neural** (1, 2). B) Tancament incomplet del tub neural donant lloc a l'espina bífida (Font: <https://sites.psu.edu/plaviqilar/2013/04/12/>).

L'espina bífida pot ser diagnosticada durant el primer i segon trimestre de la gestació mitjançant ecografia i a través del test de la fetoproteïna del sèrum matern. Resultats positius d'aquests mètodes de *screening* poden confirmar-se amb l'amniocentesi per tal d'analitzar el cariotip fetal o la Resonància Magnètica Nuclear (RMN) (3).

L'etiologia de la malaltia és multifactorial, i tant factors genètics com ambientals hi juguen un paper important. En menys del 10% dels nens amb espina bífida s'identifiquen anomalies cromosòmiques (per exemple, trisomia del cromosoma

13 o 18), mutacions genètiques o causes teratogèniques (4). Moltes vegades la causa exacta és desconeguda. Tot i així, la ingesta inadequada d'àcid fòlic abans i durant la primera etapa de l'embaràs, l'obesitat, la diabetis mellitus o els medicaments anticonvulsius estan associats a un augment del risc de desenvolupar espina bífida (5, 6).

Segons els últims informes publicats per Orphanet, la prevalença mitjana de l'espina bífida al naixement a Europa és de 18.6 per cada 100.000 habitants (7). Tot i així, cal tenir en compte que un cop diagnosticada la patologia, un percentatge elevat de mares decideixen interrompre la gestació. Per tant, la freqüència real és, fins i tot, més elevada. A Espanya, per exemple, segons les xifres publicades per EUROCAT (European Surveillance of Congenital Anomalies), els embarassos interromputs després del diagnòstic d'espina bífida podrien representar més del 80% durant el període 2008-2012.

El **Mielomeningocele** (MMC) és la forma més comú i més severa d'espina bífida. Es caracteritza perquè una porció de la medul·la espinal i les seves arrels nervioses fan protrusió a través del defecte de tancament de la part posterior de la vèrtebra (Figura 1.2.). Normalment el teixit nerviós es troba en aquestes zones, contingut en un sac similar a un quist i banyat pel líquid amniòtic (AF) circumdant.

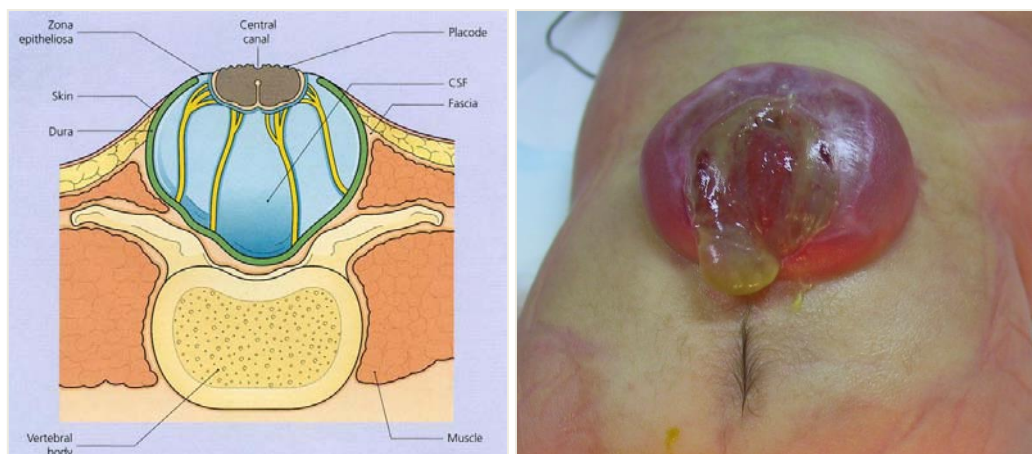


Figura 1.2. Anatomia del Mielomeningocele: exposició de la medul·la espinal i meninges cap a l'exterior (Font: Imatge cedida per Dr. Cesar G. Garcia Fontecha, Hospital Universitari Vall d'Hebron).

Gran part d'aquests defectes es localitzen a la zona lumbosacra i provoquen dèficits neurològics variables que depenen de la localització i extensió de la lesió.

El teixit neural exposat pateix un procés de deteriorament progressiu i irreversible a l'interior de l'úter a causa de l'acció química de l'AF que envolta el fetus i, també, a

l'acció traumàtica de fregament d'aquest teixit amb les parets de l'úter, que es veu accentuada en la segona meitat de la gestació (8, 9).

Aquest defecte de tancament produeix una pèrdua contínua de líquid cefaloraquidi (LCR), que normalment revesteix el cervell i la medul·la espinal. A conseqüència, es produeix una malformació cranial coneguda amb el nom de Síndrome de Chiari II, caracteritzat per un defecte de desenvolupament de la fosa posterior i la herniació de les amígdales cerebel·loso i la vermis a través del "Foramen Magnum" (10, 11) (Figura 1.3.). D'aquest fet, se'n deriva un trastorn del circuit del líquid cefaloraquidi i la majoria dels pacients desenvolupen hidrocefàlia o dilatació dels ventricles cerebrals (12). A més de tot això, s'han identificat trastorns de migració neuronal cortical que acompanyen el quadre malformatiu i podrien ser responsables de trastorns cognitius (13).

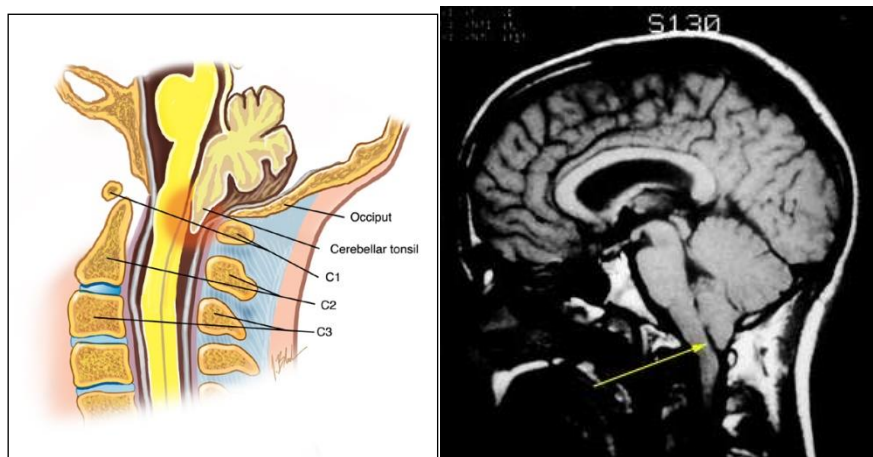


Figura 1.3. Síndrome de Chiari II, en què s'observa herniació del cervell (fletxa groga) (Font: <http://www.quiasdeneuro.com/malformaciones-de-arnold-chiari-y-dandy-walker/> i <http://www.dizziness-and-balance.com/disorders/central/cerebellar/chiari.html>).

La malformació cerebral de Chiari progressa durant la gestació i és la responsable de múltiples trastorns neurològics en el nounat, així com d'una alta mortalitat en la primera dècada de la vida (14).

A conseqüència de tot això, els nounats amb MMC presenten problemes de deglució, trastorns sensitius, disfunció d'esfínters, retard mental, alteracions motores (paraplegia), deformitats ortopèdiques secundàries a la columna o extremitats inferiors (com l'escoliosis, la luxació de maluc o el peu equinovar) i problemes respiratoris, entre d'altres (15).

Per tant, el tractament d'aquests pacients és molt complex. Requereix múltiples ingressos hospitalaris i intervencions quirúrgiques amb seguiment d'equips

multidisciplinaris. L'impacte a l'àmbit familiar, social i econòmic del MMC és enorme.

A tall d'exemple, segons un estudi fet a Alemanya i publicat recentment, el cost mèdic associat als nens amb espina bífida és 9.8 vegades superior a la mitjana durant els seus primers 10 anys de vida (16).

1.2. APROXIMACIONS TERAPÈUTIQUES ACTUALS DEL MMC

Tradicionalment, les famílies amb un diagnòstic de MMC han escollit la interrupció de l'embaràs. O bé, el tancament del defecte després del naixement que obligarà després a practicar tractaments pal·liatius, cirurgies correctores i mesures rehabilitadores durant tota la vida, però sobretot, en els primers anys de vida de la criatura com a alternativa. Tot i així, durant els últims anys, els avenços tecnològics i biomèdics han generat altres opcions terapèutiques de gran rellevància.

1.2.1. REPARACIÓ POSTNATAL DEL MMC

Una vegada la criatura amb MMC ha nascut, i durant les primeres 48 hores, és intervingut per tal de cobrir la zona exposada amb l'objectiu de prevenir infeccions i tractar la hidrocefàlia.

El recobriment de les estructures nervioses exposades inclou la dissecció de la Duramàter, que es troba oberta i adherida al teixit lateral, la tubulització d'aquesta per tancar en el seu interior les estructures neurològiques i, finalment, el cobriment amb musculatura i tancament cutani de la zona (Figura 1.4.).

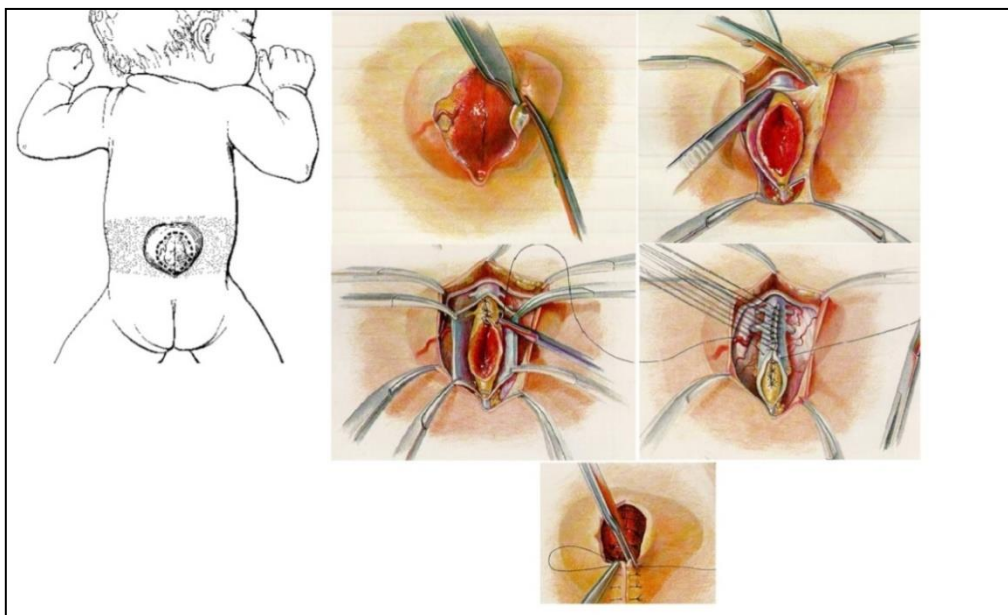


Figura 1.4. Tècnica habitual de reparació postnatal del MMC (Font: <http://es.slideshare.net/xconox/patologia-del-desarrollo-craneal>).

Aquest tipus de cirurgies no són senzilles, ja que a vegades no hi ha prou musculatura o pell per poder fer el tancament directe i per això les sutures queden en tensió o cal fer *flaps* musculars i/o cutanis per aconseguir tancar el defecte.

A més, la majoria de nens desenvolupen hidrocefàlia i precisen la col·locació de sistemes de drenatge utilitzant vàlvules de derivació des del crani (ventricles cerebrals) a l'abdomen (17).

Tot i així, és molt important tenir en compte que el teixit nerviós danyat o perdut no podrà ser reparat ni la seva funció restituïda. És per aquest motiu que les aproximacions terapèutiques del MMC aplicables durant l'etapa fetal esdevenen d'especial interès.

Posteriorment a la intervenció de reparació postnatal i també durant el creixement del nen es poden produir complicacions. Una de les més destacables és l'anomenada medul·la espinal ancorada que es caracteritza perquè la medul·la espinal es queda adherida a la cicatriu quirúrgica de la reparació, sense possibilitat de poder-se moure i ascendir en altura en el creixement dels nens. A conseqüència, la medul·la s'estira anormalment i pot donar lloc a l'empitjorament de la funció muscular de les cames, intestins i bufeta urinària.

A més de la intervenció per desancorar la medul·la espinal, alguns nens requereixen cirurgies correctores per tractar deformitats ortopèdiques secundàries que poden afectar els peus (com el peu equinovar), els malucs (com la luxació paralítica) o la columna vertebral (com l'escoliosi paralítica).

Precisament, l'escoliosi paralítica per sota del nivell de lesió, és una de les complicacions més freqüents. Normalment requereix cirurgia de fusió vertebral, especialment difícil perquè manquen les estructures òssies on fixar els sistemes metàl·lics d'estabilització vertebral.

1.2.2. ESTUDIS EN MODELS ANIMALS

S'han generat diversos models animals del MMC per tal d'estudiar la patologia i la seva evolució, entre els quals cal destacar el model en conill (18), en rata (19) i el model induït quirúrgicament en ovella (20).

El model oví fetal presenta avantatges significatives en recerca pediàtrica i cirurgia reconstructora com són una gestació de només un o dos fetus, la durada del període de gestació, el desenvolupament fisiològic i mida del fetus al llarg de la gestació, que és comparable a l'humà.

El model de MMC induït quirúrgicament en ovella va ser inicialment desenvolupat per l'equip del Dr. Michael Harrison (Fetal Treatment Center, University of California) durant la dècada del 1990 i, tot i no reproduir el defecte de desenvolupament del tub neural, sí que reproduïx la pèrdua prolongada de LCR i l'exposició de la medul·la espinal a l'AF durant la gestació (20).

En el moment de néixer, els nounats ovins havien generat el MMC cístic equivalent a l'humà. A més, el cerebel, i amb cert grau de probabilitat també el bulb raquidi, es trobava herniat per sota del foramen màgnum en un grau considerable. S'observava la reducció de la densitat de les fibres axonals també, una clara disfunció motora en les extremitats posteriors, incontinència urinària i un estat mental deprimit. Tot i així, es considera que el model té similituds parcials amb el MMC humà ja que poden no exhibir altres possibles alteracions característiques com la hidrocefàlia, la siringomièlia o anormalitats cerebrals, entre d'altres (21, 22).

El fet que les alteracions neurològiques siguin progressives i que, a més, siguin bàsicament a causa de la lesió secundària del teixit neural, i no tant a la malformació primària en si, constitueixen la raó per tractar els pacients amb MMC abans del naixement (23, 24).

És per aquest motiu que es van portar a terme diversos estudis experimentals de reparació prenatal del MMC en model oví que van demostrar que la correcció quirúrgica de la malformació intraúter resultava en un menor grau de lesió neurològica al néixer, s'evitava o es disminuïa el grau d'herniació cerebral (malformació de Chiari) així com la hidrocefàlia (25-27).

1.2.3. REPARACIÓ PRENATAL DEL MMC

Paral·lelament als estudis en animals, el grup liderat pel Dr. Scott Adzick (Center for Fetal Diagnosis and Treatment, Children's Hospital of Philadelphia) va començar a treballar en la reparació fetal del MMC en humans. Aquesta intervenció es pot dur a terme entre les setmanes 20 i 26 de gestació (28). Després de practicar la reparació intraúter del MMC en 50 fetus, els resultats suggerien que l'herniació del cerebel era reversible i que la disminució de la necessitat de derivació ventriculo-peritoneal (29).

Aquests resultats s'han confirmat amb l'assaig clínic randomitzat multicèntric (NCT00060606) portat a terme a Estats Units durant el període de 2003 a 2010 i que han demostrat que la reparació prenatal del MMC és una opció terapèutica real (30). Comparant els resultats de la cirurgia prenatal amb la postnatal en un total de 183 casos, es va confirmar que la necessitat de drenatges del líquid cefaloraquídi

als 12 mesos de naixement es reduïa. A més, després de 30 mesos de seguiment, els nens presentaven millores en l'estat motor dels membres inferiors i una disminució de l'herniació del cervell associat a la malformació de Chiari II. Als 5 anys, els nens operats prenatalment semblaven tenir millor estat neurocognitiu, motor i urinari que aquells reparats després del naixement.

En aquest mateix sentit, diversos grups han reportat resultats comparables utilitzant variacions de la tècnica anterior. Entre ells, un primer grup que ha publicat el tancament de la placode neural i la duramàter seguit de la cobertura del MMC amb un pegat de pericardi boví i fibrina en una sèrie de 8 pacients (31). També el grup constituït per l'equip de Cirurgia Pediàtrica de l'Hospital de la Vall d'Hebron de Barcelona, ha utilitzat el pegat sintètic Matriderm[®] (substitut de pell) i l'adhesiu biològic COSEAL[®] com a segellant extern en un total de més de 20 pacients (dades no publicades).



Figura 1.5. Cirurgia oberta del MMC per part de l'equip de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. Equip Clínic: Dr. C. G. Fontecha, Dr. JL Peiró, Dra. G Pellizzo , Dra. G Ottavio.

Tot i això, cal tenir en compte, que aquesta millora va associada a certs riscos per a la mare i també per al fetus (32). El principal risc de la reparació prenatal del MMC per al fetus és la mort fetal, però també les complicacions d'un part prematur. Per la mare gestant, els principals riscos són la infecció, el part prematur, la ruptura uterina, infecció i, fins i tot, la mort (33).

1.2.4. ASPECTES NO RESULTATS

El teixit que tanca la zona del defecte utilitzant solament una cobertura, esdevé en una arquitectura desorganitzada i l'absència sistemàtica d'arc vertebral posterior.

La presència de teixit fibroconnectiu afavoreix el desenvolupament de la medul·la ancorada amb progressiu deteriorament de la funció neurològica i la necessitat de cirurgies obligades. L'absència d'elements osteocartilaginosos posteriors afavoreix l'aparició de deformitats esquelètiques (cifoesciosi) i dificulta la correcció quirúrgica ja que no existeix un suport on fixar els suports metàl·lics. A conseqüència, sovint les cirurgies fracassen i es requereix noves intervencions quirúrgiques.

Per tant, la generació d'un teixit organitzat de tipus osteocartilaginós en la zona del MMC podria tenir un paper en la preservació de la funció neurològica i de l'anatomia local disminuint el risc de deformitats ortopèdiques secundàries.

1.3. TEIXIT OSSI

El teixit ossi és un teixit connectiu especialitzat format per diferents tipus cel·lulars en una matriu extracel·lular composta bàsicament per minerals, proteïnes i aigua. Tot i la seva duresa, és un teixit dinàmic que canvia de forma constantment en funció de les forces que suporta.

1.3.1. FUNCIÓ I ESTRUCTURA DEL TEIXIT OSSI

Els ossos tenen funcions mecàniques, sintètiques i metabòliques. Les funcions mecàniques són bàsicament de protecció interna del òrgans, suport del cos i interacció amb els músculs i tendons per generar moviment. La funció sintètica radica en el procés anomenat hematopoesi i que és portada a terme pel moll d'ós (34). Finalment, la funció metabòlica, està dirigida a actuar com a reservori de calci, fòsfor, factors de creixement i greix.

1.3.1.1. Matriu òssia

En la matriu òssia es distingeixen dos components:

A) Component inorgànic

La fase mineral de l'os que constitueix aproximadament el 65% és bàsicament fosfat càlcic en forma de cristalls d'hidroxiapatita, i altres elements com el bicarbonat, citrat, magnesi sodi i potassi. Els cristalls d'hidroxiapatita es disposen de forma ordenada al llarg de les fibres de col·lagen I, i d'aquesta conjunció se'n deriven la força i duresa de l'os.

B) Component orgànic

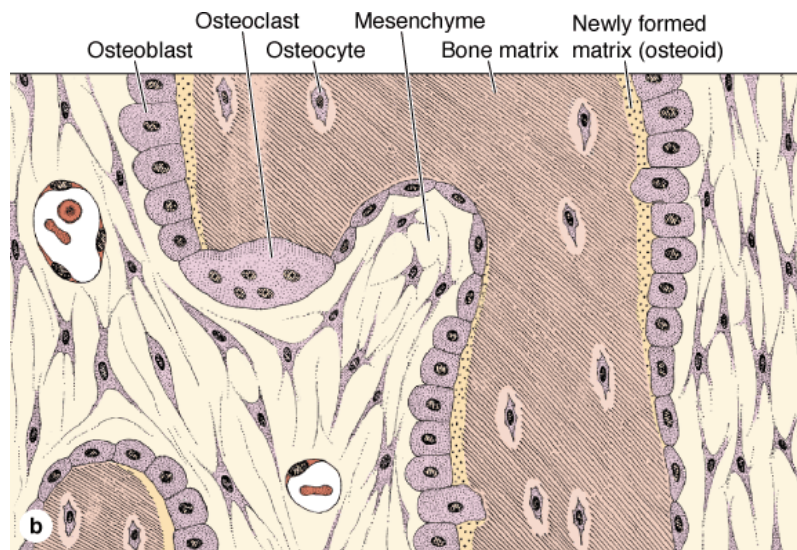
Les propietats bioquímiques depenen de la fase orgànica, que constitueix el 35%, i està formada en un 80-90% per col·lagen tipus I. El restant està compost per factors de creixement, citocines, osteopontina, osteonectina, osteocalcina, proteïnes inductores, sialoproteïnes, proteoglicans, fosfoproteïnes i fosfolípids

1.3.1.2. Les cèl·lules

En el teixit ossi trobem tres tipus principals de cèl·lules:

A) Osteoblasts

Els osteoblasts deriven de les cèl·lules mesenquimals estromals i es localitzen a la superfície de l'os. La seva principal funció és la síntesi de la matriu òssia, incloent el col·lagen, proteoglicans i glucoproteïnes. Durant la formació activa d'os, les cèl·lules secreten concentracions elevades de fosfatasa alcalina. L'osteoblast queda rodejada de la matriu que secreta fins a quedar atrapada en la llacuna i es converteix en osteòcit. La majoria de matriu es calcifica, a excepció d'una petita capa no calcificada denominada osteoide.



Source: Mescher AL: *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition*: <http://www.accessmedicine.com>
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Figura 1.6. Representació gràfica de la relació entre els osteoblasts, els osteòcits i la matriu òssia (Font: <http://histonano.com/books/Junqueira's%20Basic%20Histology%20PDF%20WHOLE%20BOOK/8.%20Bone.htm>).

B) Osteòcits

Són les cèl·lules òssies diferenciades derivades dels osteoblasts, altament especialitzades i ubicades dins de la matriu calcificada de les llacunes. Els osteòcits

emeten llargues prolongacions citoplasmàtiques a través dels canalicles, per connectar amb altres osteòcits veïns així com alimentar-se amb els metabòlits i nutrients del líquid extracel·lular. Tot i que semblen cèl·lules inactives, els osteòcits alliberen factors que faciliten la incorporació de les cèl·lules progenitores dels osteoblasts, afavorint la remodelació del teixit.

C) Osteoclasts

Els osteoclasts són cèl·lules multinucleades derivades de les cèl·lules progenitores de granulòcits i macròfags i tenen una funció de reabsorció de l'os. Aquestes cèl·lules ocupen les depressions buides anomenades llacunes de Howship.

1.3.1.3. Tipus d'os

D'acord amb la seva forma anatòmica els ossos es classifiquen amb ossos llargs, curts, plans, ossos irregulars i sesamoides. Segons la seva estructura poden ser de tipus trabecular (esponjós) o cortical (lamel·lar).

A) Trabecular:

L'os de tipus trabecular és una xarxa porosa interconnectada que pot prendre diferents configuracions. Està localitzat a l'epífisi del ossos llargs i a l'interior dels ossos plans.

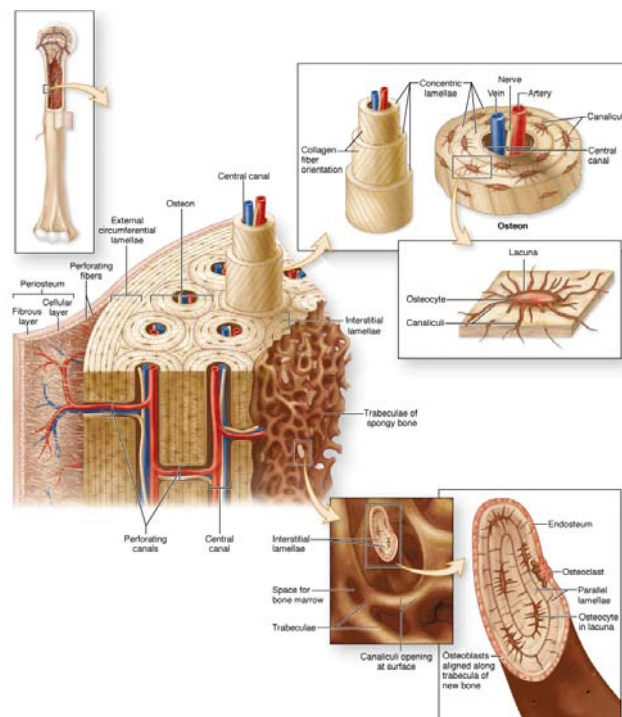


Figura 1.7. Representació gràfica de l'estructura tridimensional d'un os llarg. A la part més externa es localitza el periosti, a continuació l'os compacte format per les seves unitats estructurals (osteones), i la part interna l'os trabecular (35).

B) Cortical

L'os de tipus cortical està format per unitats estructurals anomenades osteona o sistemes de Haver i que es troben distribuïdes al llarg de l'estructura de l'os. Dins els osteons, hi trobem les petites llacunes que alberguen els osteòcits. A més, contenen un canal central per on transiten vasos i nervis, i els diminuts canals que proporcionen nutrients i oxigen a les cèl·lules.

1.3.2. OSTEOGÈNESI

La formació del teixit ossi durant el desenvolupament embrionari pot ser de dos tipus: l'ossificació intramembranosa i l'endocondral.

1.3.2.1. Ossificació intramembranosa

L'ossificació intermembranosa es produeix directament des del teixit mesenquimal molt vascularitzat o sobretot es dona en ossos plans.

Les MSCs es diferencien a osteoblasts i secreten matriu òssia, formant una xarxa d'espícules i trabècules, les superfícies de les quals estan poblades per aquestes cèl·lules. Aquesta regió d'osteogènesi inicial s'anomena centre primari d'ossificació i les fibres de col·lagen aquí es distribueixen de forma aleatòria. Una vegada s'ha donat la calcificació i els osteoblasts deriven en osteòcits, l'activitat mitòtica i de diferenciació de les MSCs és la que donarà lloc a nous osteoblasts.

A mesura que s'estableix una xarxa de trabècules similar a una esponja, el teixit connectiu vascular es transforma en medul·la òssia en els seus intersticis. Les regions de teixit mesenquimal que es mantenen sense diferenciar es converteixen en el periosti (capa externa) i endosti (capa interna) de l'os en desenvolupament.



Figura 1.8. Imatge de l'ossificació intermembranosa. Es formen trabècules d'os per osteoblasts que recobreixen la seva superfície (fletxes negres). S'observen osteòcits (puntes de fletxa negra) atrapats en les llacunes (36).

1.3.2.2. Ossificació endocondral

Aquest tipus d'ossificació es dona en ossos llargs i curts, i requereix el desenvolupament inicial d'un motlle de cartílag hialí generat a partir de les cèl·lules mesenquimals. Part dels condrocits maduren, s'hipertrofen i dipositen cristalls d'hidroxiapatita en la matriu extracel·lular. Vasos i cèl·lules osteoprogenitores envaeixen la matriu i es diferencien a osteoblasts donant lloc al centre d'ossificació primari, on el cartílag hipertròfic es va substituint per os.

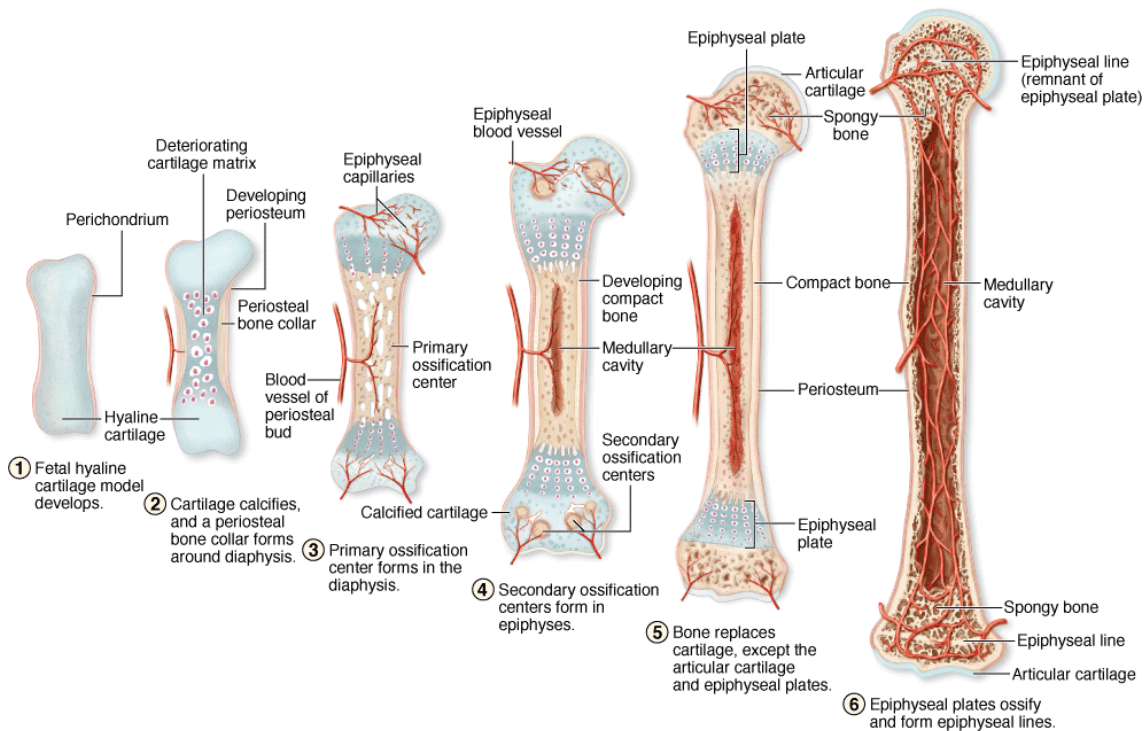


Figura 1.9. Etapes de l'ossificació endocondral (35).

1.3.3. COMPOSICIÓ DEL TEIXIT DIANA QUE ES PRETÉN REGENERAR

Les vèrtebres són els elements ossis superposats que formen la columna vertebral i envolten i protegeixen la medul·la espinal que es troba continguda en el conducte raquidi.

En funció de la seva posició es distingeixen diferents tipus de vèrtebres: cervicals, toràciques, lumbars, sacres i coccígies. Totes elles comprenen les següents parts principals (37): el cos vertebral, els pedicles, les làmines vertebrals, l'apòfisi espinosa, les apòfisis transverses i les apòfisis articulars (inferior i superior) (Figura 1.10.A.).

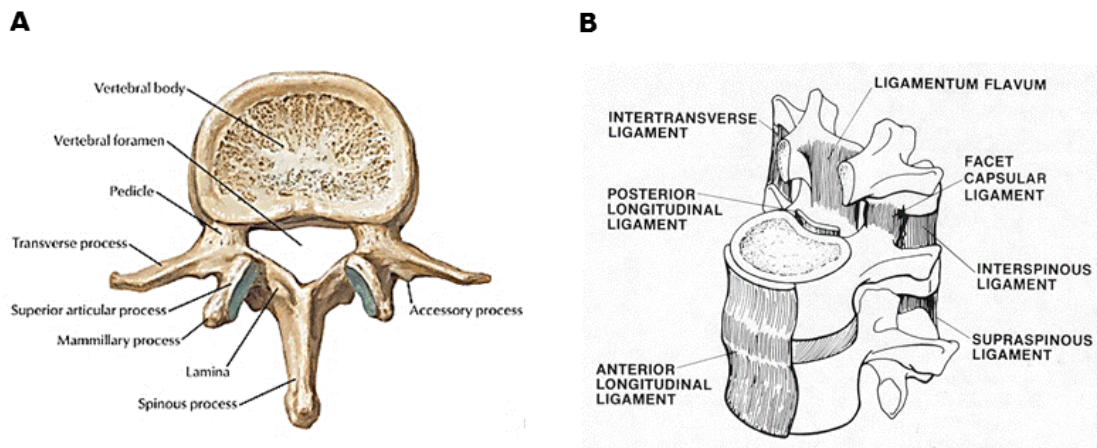


Figura 1.10. A) Vista superior d'una vèrtebra de la zona lumbar i B) Unitat Funcional de Junhans formada per dues vèrtebres, el disc intervertebral i els lligaments que les uneixen. (Font: http://www.backpainguide.com/Chapter_Fig_folders/Ch05_Anatomy_Folder/1LumbVert.html i <http://www.academia.cat/files/425-1017-DOCUMENT/Fontecha-221010-54.pdf>).

S'articulen mitjançant el complex triarticular format pel disc intervertebral i les apòfisis articulars posteriors. A més, estan unides per una sèrie d'estructures lligamentoses (Figura 1.10.B.).

Les vèrtebres inicialment cartilaginoses s'ossifiquen durant el període fetal a partir de tres centres d'ossificació primaris: un al mig pel cos vertebral i dos laterals a l'arc neural en el punt d'unió dels pedicles, la làmina i l'apòfisi transversa (Figura 1.11.).

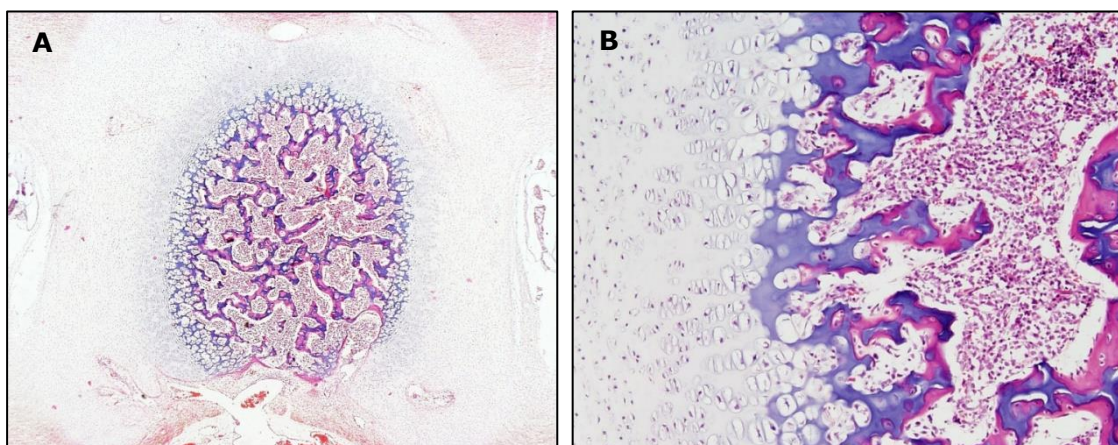


Figura 1.11. Ossificació endocondral en el cos d'una vèrtebra fetal: A) Visió general i B) Visió ampliada (Font: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:Bone_histology_014.jpg#file).

Els punts d'ossificació principals apareixen al voltant de la 9ena setmana de vida intrauterina. Primerament, en els arcs laterals de les vèrtebres cervicals i toràciques superiors i, ràpidament, s'estén fins a les vèrtebres lumbars.

Posteriorment, els punts d'ossificació en el cos vertebral inicien l'aparició en canvi en la zona toracico-lumbar i progressa al final de la 10ena setmana de gestació bidireccionalment cap a la regió cervical i sacra (38).

A més, les vèrtebres tenen diversos centres secundaris de creixement (dos als platets vertebrals, un punt pel vèrtex de l'apòfisi espinosa, un punt pel vèrtex de l'apòfisi transversa, un punt per l'apòfisi articular superior i un per les apòfisis articulars inferiors), que acaben ossificant-se al final de la maduració esquelètica (Figura 1.12.).



Figura 1.12. Tall histològic d'una vèrtebra ovina on s'observa la zona de creixement de l'extrem de l'apòfisi espinosa (fletxa groga) i als platets vertebrals (fletxes vermelles).

1.4. L'ENGINYERIA TISSULAR COM A APROXIMACIÓ TERAPÈUTICA DEL MMC

En el marc de la medicina regenerativa, l'enginyeria tissular (ET) ha emergit durant les últimes dècades com una nova disciplina científica i té com a finalitat el desenvolupament de teràpies encaminades a la reparació, substitució o regeneració de teixits lesionats o perduts. Més enllà, pretén contribuir en la millora de la qualitat de vida dels pacients (39). L'ET utilitza els principis i mètodes de la biologia, bioenginyeria, bioquímica, ciència del materials i la farmacologia per entendre l'estructura i funció dels teixits sans i patològics.

Actualment, l'aplicabilitat terapèutica dels productes de teràpia cel·lular i enginyeria tissular està essent intensament estudiada per un gran nombre de grups de recerca i grups clínics per un ampli ventall d'aplicacions biomèdiques com la regeneració de pell en grans cremats, el tractament de lesions de cartílag articular, generació de vàlvules cardíaques biològiques, el restabliment d'estructures musculars i òssies

defectuoses, la regeneració de la medul·la espinal lesionada o del teixit conjuntiu en malalties oftalmològiques (40-48). A més, també ha esdevingut una prometedora alternativa a la reconstrucció quirúrgica durant el període gestacional per a malalties prenatsals com el Mielomeningocele (49-51).

Tradicionalment, l'ET ha fet ús de tres eines claus que intervenen en el procés de la regeneració tissular: les cèl·lules, les biomatrius i els factors de senyalització. En les darrers anys, a més, s'ha identificat i reconegut l'ambient mecànic de la zona lesionada com al quart element crític, constituint el que s'anomena "concepte diamant" (52).

1.4.1. CÈL·LULES

El component cel·lular pot ser endogen, exogen o una combinació d'ambdós. L'ús d'una font exògena pot requerir-se si les cèl·lules endògenes del teixit a reparar no són funcionals. (53)

Les cèl·lules poden ser directament injectades al lloc de la lesió, o pel contrari, utilitzades per colonitzar matrius biocompatibles. Una vegada administrades poden participar directament en la regeneració del teixit, o bé tenir una acció indirecta mitjançant mecanismes de tipus paracrí.

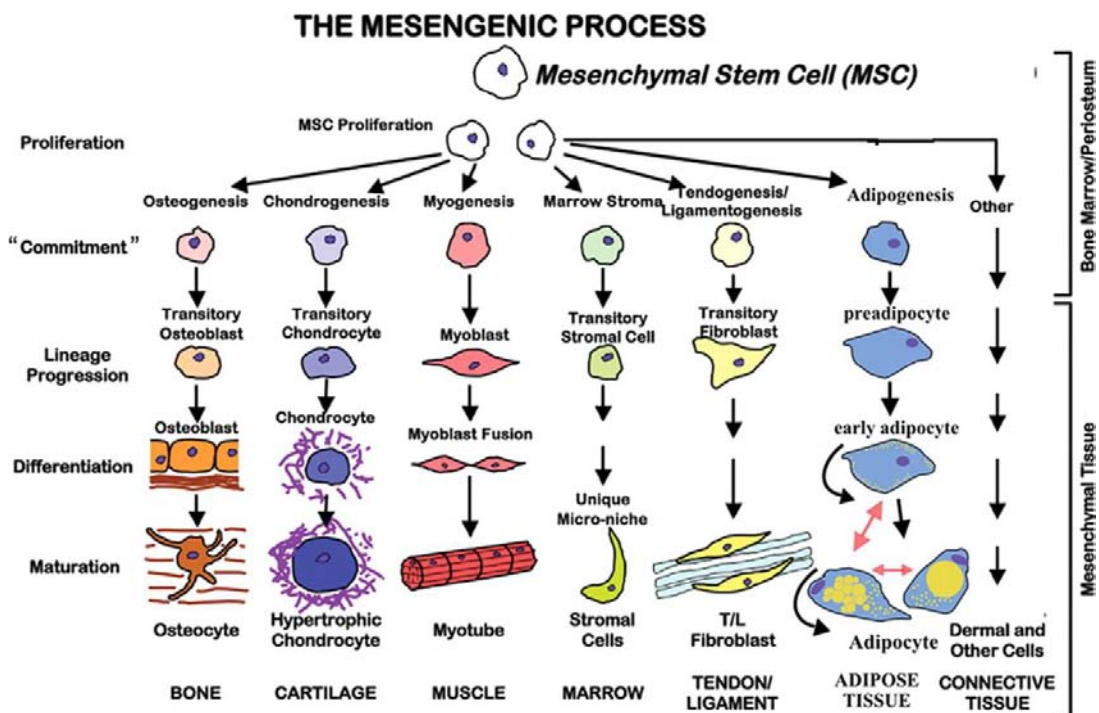


Figura 1.13. Procés de diferenciació de les MSCs als diferents llinatges mesodèrmics (Font: International Cartilage Repair Society).

A més, segons el tipus cel·lular escollit poden tenir diferents graus de potencialitat. Pel desenvolupament de productes d'ET destinats a la regeneració del teixit ossi, les MSCs són probablement les més utilitzades. Són les cèl·lules progenitores dels llinatges mesodèrmics (Figura 1.13.) i poden ser obtingudes de fonts diverses com el moll d'os, el greix, però també de diferents teixits extraembrionaris tal com es detallarà posteriorment al *Capítol 3: Aïllament, expansió i caracterització de cèl·lules mesenquimals estromals de líquid amniòtic* (54).

1.4.2. BIOMATRIUS

Les biomatrius actuen com a suport i poden derivar de materials naturals, sintètics o ser acel·lulars. Estan específicament dissenyades per mimetitzar la matriu extracel·lular del teixit que es vol tractar, permetre la colonització cel·lular i el trànsit de nutrients des dels teixits circumdants.

Alhora de dissenyar les biomatrius, s'han de considerar propietats com la seva biofuncionalitat, la biocompatibilitat, la capacitat de degradació, les propietats mecàniques, la grandària del porus i el grau de porositat. Addicionalment, s'han de poder fabricar amb la forma i grandària adequada a la lesió, que pugui ser esterilitzat i tingui un període d'estabilitat suficient fins la seva implantació (55).

Les estratègies d'enginyeria del teixit esquelètic contempnen la utilització de biomatrius sintètiques com els metalls porosos, els polímers sintètics i els fosfats càlcics com al hidroxihapatita o el fosfat tricàlcic. Entre els empelts de tipus biològics s'inclouen el corals, els polímers naturals (tipus quitosan, fibrina, alginat o gelatina) i la matriu òssia desmineralitzada (56, 57). Cadascuna d'elles presenta unes característiques específiques, i que requereixen ser avaluades, relatives a:

- C) Osteoconducció: capacitat de permetre a les cèl·lules adherir-se, proliferar i formar matriu extracel·lular en la seva superfície o porus. Aquesta propietat està relacionada amb taxa de degradació de la matriu, ja que la biomatriu ha de ser reabsorbida per deixar espai al teixit en formació (58).
- D) Osteoinducció: capacitat d'induir la formació de nou teixit ossi a través d'estímuls moleculars i mecànics, reclutant cèl·lules progenitores i facilitant la seva diferenciació al llinatge osteogènic.
- E) Osteogenicitat: capacitat d'actuar de reservori per als osteoblasts o cèl·lules mesenquimals estromals (MSCs) perquè aquestes cèl·lules puguin formar nova matriu extracel·lular, mineralitzar-la donant lloc a nou teixit ossi.

F) Osteointegració: capacitat de la biomatriu de formar unions estables i en continuïtat amb el teixit circumdant.

1.4.3. FACTORS DE SENYALITZACIÓ

Són substàncies que actuen com a senyals bioquímics i la seva addició en els constructes pot millorar la regeneració tissular, estimulants el creixement, la proliferació i la diferenciació cel·lular (per exemple de MSCs, condrocits i osteoblasts), la reabsorció de les biomatrius i/o la formació de nous vasos (angiogènesi).

Moltes vegades les mateixes cèl·lules administrades proporcionen factors de tipus autocrí o paracrí que estimulen a les cèl·lules endògenes i a elles mateixes a participar en la formació de nou teixit.

Els factors de senyalització que han pres gran protagonisme en l'enginyeria del teixit ossi són les Proteïnes Morfogèniques de l'os (BMPs), el Factor de Creixement Fibroblàstic (FGF), el Factor de Creixement Insulina-Like (IGF), els Factors de creixement derivats de Plaquetes (PDGF) i el Factor de Transformació del Creixement β (TGF- β).

1.5. ENGINYERIA TISSULAR PEL TRACTAMENT FETAL DEL MMC

A l'hora d'aplicar estratègies d'ET per al tractament prenatal del MMC cal tenir en compte les particularitats de l'ambient fetal, com també la dificultat de manipulació durant la reparació del MMC, la grandària del fetus, com es dona el procés de cicatrització i regeneració tissular a nivell fetal, entre d'altres.

Fins al moment, els estudis d'ET portats a terme per la reparació prenatal del MMC han anat destinats a dos objectius principals:

- 1) Proporcionar una matriu per cobrir el defecte i així evitar el dany induït pel contacte amb l'AF durant la gestació;
- 2) Implantar biomatrius i/o cèl·lules entre el teixit neural i la pell per evitar el fenomen de la medul·la espinal ancorada i/o, al mateix temps, administrar factors neurotròfics per promoure la regeneració del teixit neural.

Les matrius destinades a reparar el MMC han de ser biodegradables, impermeables (per evitar la sortida de l'AF), tenir una força mecànica adequada, que permetin el creixement cel·lular, la neovascularització i redueixin la formació de teixit cicatricial.

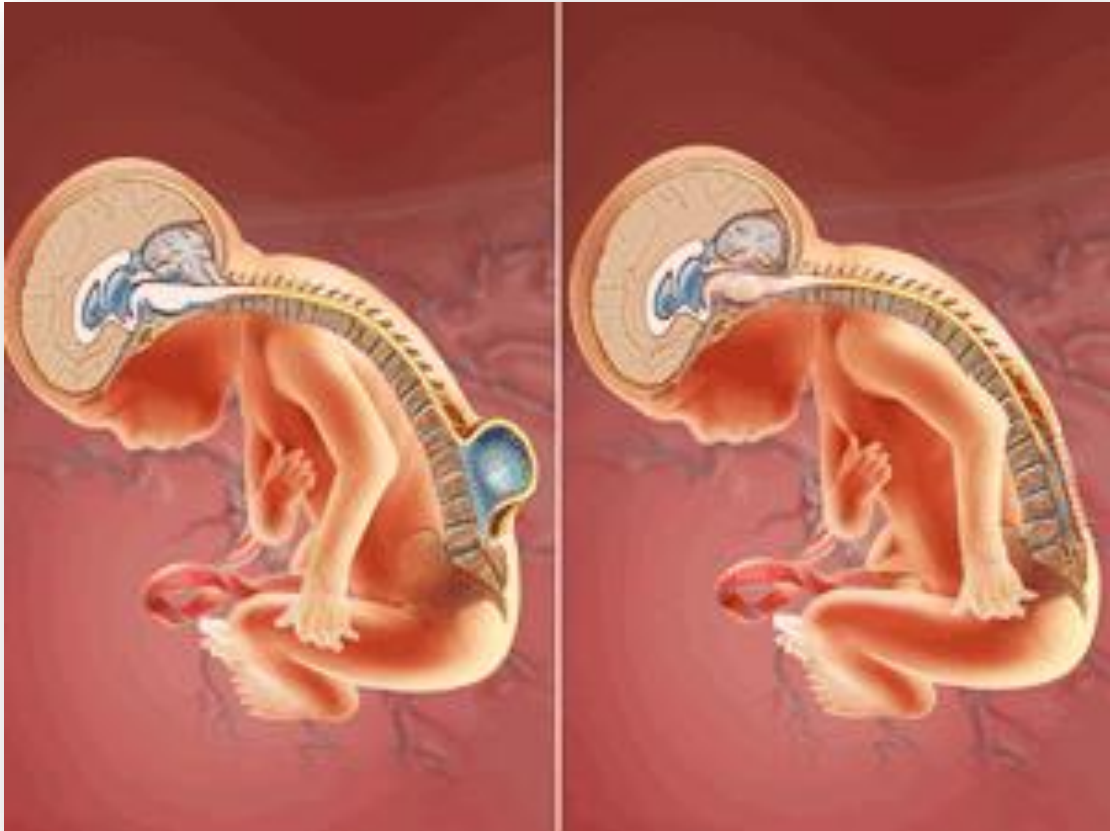
Respecte a la cobertura del defecte amb biomatrius, s'han utilitzat tant materials naturals com el col·lagen o la gelatina, i també materials sintètics com la silicona, el

polipropilè i, fins i tot, una biomatriu acel·lular derivada de la submucosa intestinal. De forma general, aquests estudis han reportat un tancament complet o quasi complet del MMC tan en el model de rata com en l'ovella (19, 59-64). En alguns casos, a més, va acompanyat de la disminució de dany del teixit neural i la generació d'epidermis.

Pel que fa al segon aspecte, els estudis es porten a terme en el model oví. També s'han aplicat matrius naturals com la membrana amniòtica, materials sintètics com l'àcid poli-làctic o la cel·lulosa i, també, dermis acel·lular (50, 65-69). La majoria dels treballs han publicat la formació de nova duramàter al llarg de la biomatriu, la prevenció de la medul·la ancorada i la supervivència de les cèl·lules administrades.

Tot i així, el grup del Dr. Alan W. Flake ha publicat recentment un treball en què es posa en evidència limitacions importants del disseny i execució dels estudis que dificulten la interpretació dels resultats (23). Consideren, per exemple, que el defecte creat pot ser massa petit i es pot donar la cicatrització espontània del defecte, que la reparació s'ha fet massa aviat, que els estudis histològics no són prou complets per demostrar la integració i diferenciació de les cèl·lules administrades i, el més important, que manquen els estudis funcionals associats a la regeneració del teixit neural.

En l'estat actual dels coneixements sobre la patologia sembla necessari dissenyar noves estratègies dirigides a millorar la reparació fetal del MMC. El desenvolupament d'un producte d'ET que permeti una correcta protecció del teixit neural així com la regeneració de les estructures tissulars locals pot proporcionar una millora molt important en la qualitat de vida d'aquests pacients. Aquesta és la motivació principal del treball de tesi doctoral que es presenta, en què es dissenyen diferents productes d'ET basats en la combinació de cèl·lules mesenquimals estromals (MSCs) autòlogues procedents d'AF convidades amb diferents tipus de biomatrius.



CAPÍTOL 2: OBJECTIUS

(Font imatge portada Capítol 2: http://www.chop.edu/conditions-diseases/spina-bifida/about#.VfR1O_I_s1Y).

2.1. OBJECTIU GENERAL

Desenvolupar un tractament prenatal pel Mielomeningocele basat en cèl·lules mesenquimals estromals de líquid amniòtic en un model experimental oví.

2.2. OBJECTIUS ESPECÍFICS

1. Desenvolupar un protocol optimitzat per a l'aïllament i expansió *ex vivo* de cèl·lules mesenquimals estromals procedents de líquid amniòtic oví fins a dosi clínica.
2. Caracterització fenotípica i funcional de les AF-oMSCs aïllades i expandides *ex vivo*.
3. Marcatge cel·lular pel seu posterior seguiment *in vivo*.
4. Colonització de matrius biocompatibles amb les cèl·lules mesenquimals estromals de líquid amniòtic.
5. Implantació de les biomatrius colonitzades en fetus ovins amb Mielomeningocele induït quirúrgicament.
6. Avaluació clínica i histològica del fetus ovins tractats en el moment del seu naixement.



**CAPÍTOL 3:
AÏLLAMENT, EXPANSIÓ I CARACTERITZACIÓ
DE CÈL·LULES MESENQUIMALS ESTROMALS
DE LÍQUID AMNIÒTIC OVÍ**

3.1. INTRODUCCIÓ

Els teixits extraembrionaris com el cordó umbilical (Gelatina de Wharton), la placenta, la membrana amniòtica i el l'AF són una valuosa font de cèl·lules progenitores fetals (70-73). Es considera que aquestes cèl·lules es troben en un estat de potencialitat a mig camí entre les cèl·lules mare embrionàries i les cèl·lules progenitores adultes multipotents (74-76) i, per tant, tenen potencial d'aplicació clínica en el camp de la medicina regenerativa (77, 78).

Els teixits com el cordó umbilical i la placenta esdevenen disponibles després del part i, a conseqüència, també les cèl·lules progenitores que contenen. Així doncs, la utilització d'aquestes fonts limita l'ús autòleg d'aquestes cèl·lules durant el període gestacional. L'AF, en canvi, pot ser obtingut prenatalment mitjançant amniocentesi, una tècnica mínimament invasiva i àmpliament acceptada per poder dur a terme diagnòstics prenatals de diferents patologies (79). Aquesta particularitat el fa molt valuós per utilitzar-lo com a material de partida dels tractaments autòlegs durant el període gestacional.

L'AF conté una població heterogènia de cèl·lules derivades de les tres capes germinals i múltiples tipus cel·lulars en diferents graus de diferenciació. Entre elles, les cèl·lules mesenquimals estromals (AF-MSCs) que han mostrat capacitat de diferenciació *in vitro* a llinatge adipogènic, condrogènic, osteogènic, miogènic, endotelial, neurogènic i hepatogènic (77, 78). Respecte als marcadors de membrana, presenten els receptors característics de les MSCs, és a dir, expressió de CD105, CD73, CD90, CD73, CD44, CD166 i CD29, i la manca d'expressió de marcadors hematopoètics com el CD45, CD14, CD34, CD133, CD31, CD11b, CD79 i HLA-DR (80). A més, s'ha reportat que presenten expressió positiva de marcadors embrionaris relacionats amb la capacitat d'autorenovació i pluripotència tals com Oct-4, Nanog i SSEA-3 i SSEA-4 (81, 82). És conegut també que aquestes cèl·lules posseeixen interessants propietats immunomoduladores, tropisme pels teixits danyats i s'ha demostrat l'absència de formació de tumors després de la seva administració en assajos *in vivo* (83).

Les MSCs, independentment del teixit del que provenen, solen ser-hi presents en baixes concentracions, la qual cosa en dificulta l'aïllament i caracterització. Els protocols d'aïllament de MSCs actuals es basen en la capacitat d'adherència d'aquest tipus cel·lular al plàstic (84). Aquesta estratègia influeix directament en la quantitat i qualitat de les cèl·lules progenitores obtingudes i pot determinar l'èxit de l'etapa d'aïllament (85-87). A més, la composició dels medis i suplementes de cultiu utilitzats determina el patró de creixement durant l'expansió *ex vivo* de les cèl·lules

així com la selecció de determinats fenotips (88). Així doncs, una avaluació acurada de les condicions de cultiu durant l'aïllament i expansió cel·lular una vegada obtingut l'AF és essencial per desenvolupar productes de teràpia cel·lular i enginyeria tissular aplicables en models animals experimentals.

En el moment en que es va iniciar el projecte, la informació existent en la literatura sobre les característiques cinètiques de les cèl·lules mesenquimals estromals procedents de líquid amniòtic oví (AF-oMSCs) era mínima. Tenint en compte que es volia desenvolupar un producte d'enginyeria tissular amb unes especificacions definides i en un temps limitat, es feia imprescindible aprofundir en el coneixement de les AF-oMSCs.

Així doncs, l'objectiu principal d'aquesta primera fase del treball és el desenvolupament d'un protocol optimitzat per a l'aïllament i expansió *ex vivo* de oAF-MSCs per tal de ser utilitzat posteriorment com a base d'un producte d'enginyeria tissular per aplicació en un model oví de MMC. En base a la superfície del defecte del MMC a reparar, s'estableix la dosi clínica entre 2×10^6 i 4×10^6 AF-oMSCs.

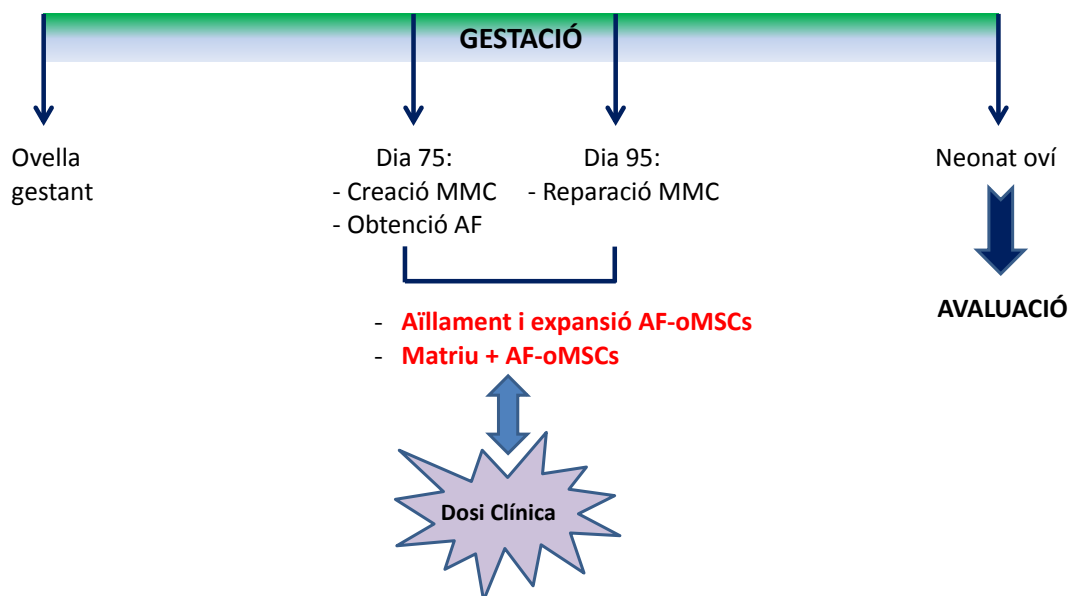


Figura 3.1. Estratègia seguida per a l'obtenció de la dosi clínica d'AF-oMSCs durant la gestació en el model oví: Aproximadament el dia 75 de gestació es fa la cirurgia d'inducció del MMC i la recollida del líquid amniòtic que serveix com a material de partida del cultiu cel·lular. Durant els següents 20 dies, s'aïllen i expandeixen les AF-oMSCs i es combinen amb diferents tipus de biomatrius per poder generar el producte d'enginyeria tissular que s'aplicarà durant la cirurgia de reparació aproximadament el dia 95 de gestació.

Per tant, tal com es recull a la figura 3.1., l'estratègia experimental proposada en aquest capítol es basa en l'obtenció d'entre 2×10^6 i 4×10^6 AF-oMSCs a partir de la mostra d'AF obtinguda durant la cirurgia d'inducció del MMC (dia 75 de gestació) i en els aproximadament 20 dies de temps que separen la cirurgia d'inducció i la cirurgia de reparació del MMC.

A més a més, es pretén caracteritzar fenotípicament les cèl·lules expandides i avaluar les seves propietats de diferenciació a llinatge mesodèrmic in vitro, per tal de confirmar que compleixen amb el perfil prèviament publicat per les MSCs d'AF humà (70).

3.2. RESULTATS

3.2.1. AÏLLAMENT DE LES AF-oMSCs

3.2.1.1. Definició del protocol per a la recollida del líquid amniòtic

Els primers experiments s'han dirigit a estudiar el protocol d'obtenció de l'AF (material de partida) en l'ovella gestant que permet una millor recuperació de les cèl·lules d'interès. En concret, s'avaluen dos protocols d'obtenció de l'AF durant la cirurgia fetal d'inducció del MMC (Figura 3.2.):

A) Aspiració amb úter obert: s'obté el líquid per aspiració amb control visual directe un cop ja s'ha obert la paret uterina per accedir al fetus.

B) Aspiració amb úter tancat: s'obté la mostra d'AF per punció a través de les parets de l'úter sense que estiguin obertes.

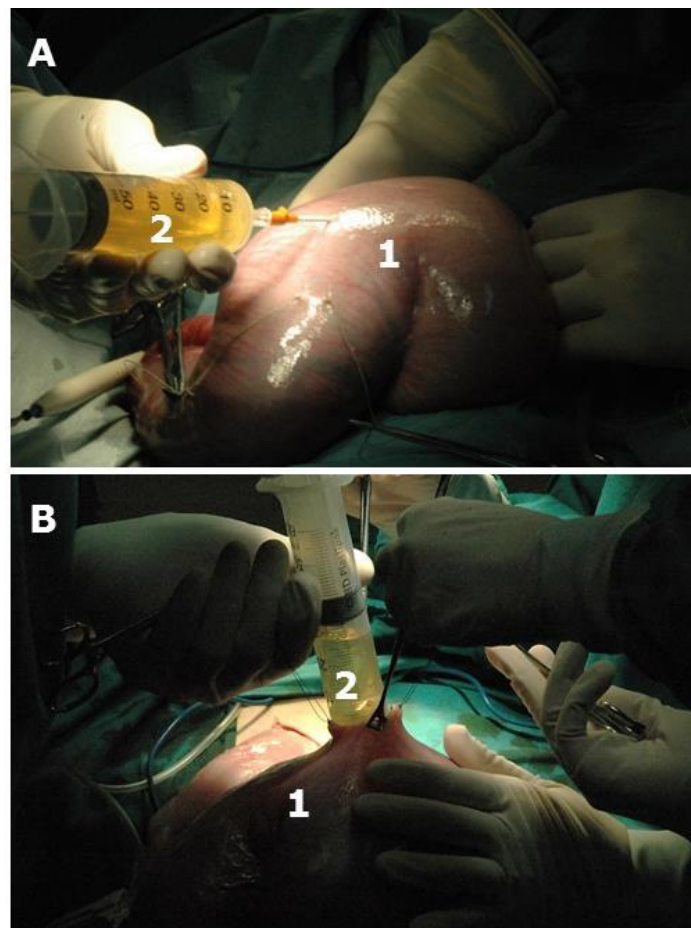


Figura 3.2. Recol·lecció del líquid amniòtic per aspiració amb l'úter tancat (A) o amb l'úter obert (B): (1) Paret de l'úter, (2) Líquid Amniòtic.

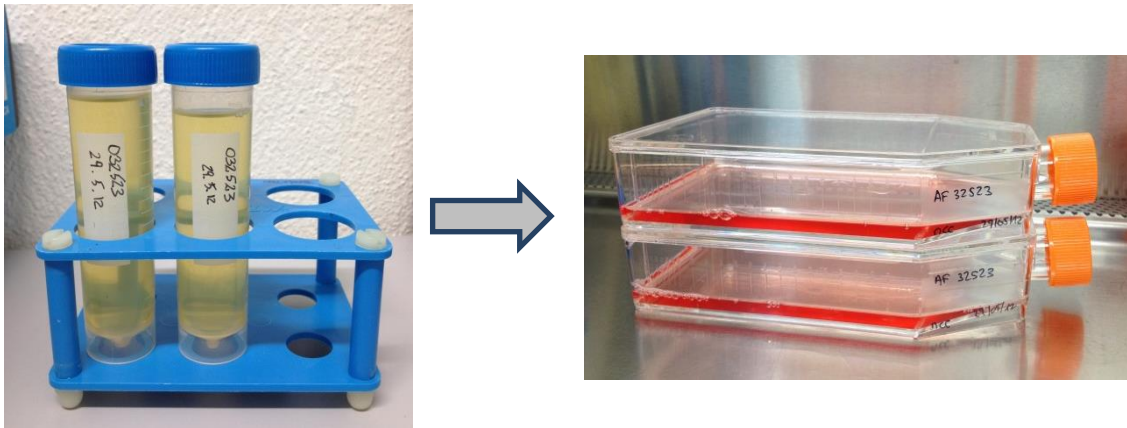


Figura 3.3. Recollida del líquid amniòtic oví en tubs falcon estèrils i sembra en flascons de cultiu per cèl·lules adherents amb addició de medi de cultiu.

Una vegada obtingut el AF, es cultiva en presència de medi de cultiu i es fa una inspecció visual cada 2-3 dies per dur a terme una valoració qualitativa del cultiu (Figura 3.3.), que permet detectar possibles contaminacions o creixement anormal de les cèl·lules.

Utilitzant aspiració amb úter obert, s'observa la presència d'alta contaminació de diversos tipus cel·lulars no adherents al cultiu entre ells eritròcits i cèl·lules que per la seva mida i morfologia semblen epitelials (Figura 3.4). A més, després de més de 10 dies en cultiu, hi ha una baixa freqüència de recuperació d'unitats formadores de colònies fibroblàstiques (CFU-Fs).

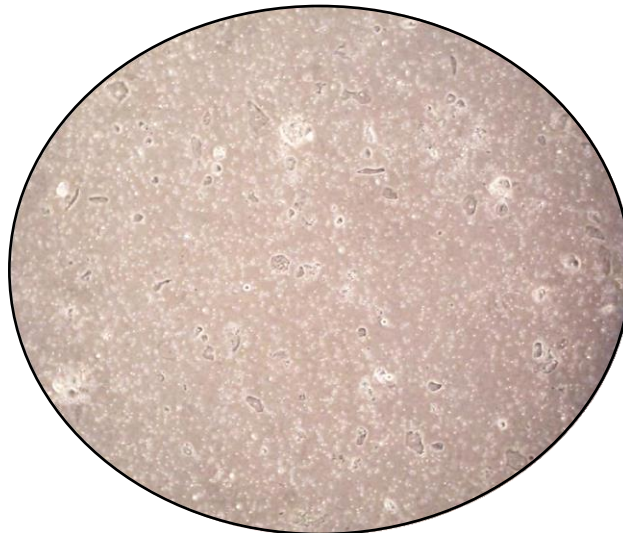


Figura 3.4. Aspecte del cultiu de líquid amniòtic aspirat amb l'úter obert (PhL, 4X). S'observa gran quantitat de cèl·lules de mida gran i forma polièdrica en suspensió i contaminació eritrocitària.

En canvi, si l'obtenció es fa per aspiració a través de les parets de l'úter, el cultiu presenta menor contaminació de cèl·lules no adherents i l'aparició de CFU-Fs

després de 4-5 dies de cultiu es fa evident, donant lloc a una recuperació major de cèl·lules AF-oMSCs (Figura 3.5.).

A partir de la valoració qualitativa dels diversos cultius, es conclou que l'obertura de la paret uterina provoca contaminació de l'AF amb sang i altres tipus cel·lulars i es decideix obtenir les mostres d'AF mitjançant aspiració amb úter tancat.

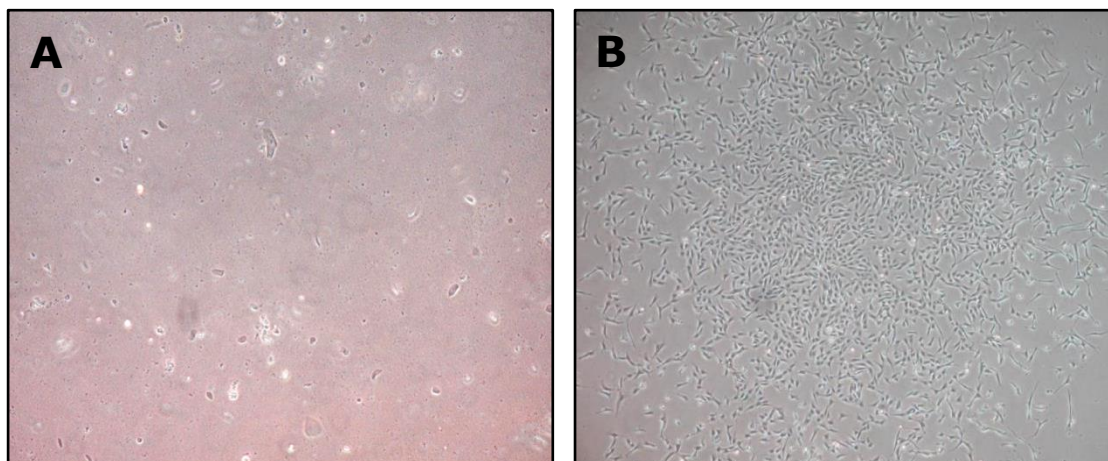


Figura 3.5. A) Cèl·lules de líquid amniòtic després de 3 dies en cultiu, previ rentat de les cèl·lules no adherents (AF 4671, PhL, 4X); B) Aspecte microscòpic d'una CFU-F a dia 10 de cultiu durant l'etapa d'aïllament de les cèl·lules mesenquimals (AF20960, PhL, 4X).

3.2.1.2. Estratègia de sembra del líquid amniòtic

Un cop escollit el mètode d'obtenció de l'AF, s'estudien diferents paràmetres de l'etapa de la sembra del mateix, per tal d'optimitzar la recuperació de les cèl·lules d'interès.

A) Efecte de la concentració del líquid amniòtic prèvia al cultiu

De forma general, en els cultius anteriors s'observa que la recuperació de cèl·lules adherents per unitat de volum d'AF cultivat és molt baixa (89). Per aquest motiu, la primera condició experimental de la següent tanda d'experiments serà cultivar el màxim de volum de mostra que permet el flascó de cultiu en l'etapa d'aïllament, concretament 40 mL. Aquest volum representa una relació de 2:1 entre el volum d'AF i del medi de cultiu.

Per altra banda, però, cal tenir en compte que aquesta relació entre volum de mostra i de medi de cultiu podria donar lloc a una limitació de la concentració de nutrients en el cultiu.

Així doncs, en la segona condició experimental es prova la recuperació de les cèl·lules havent fet una concentració de les cèl·lules contingudes en els 40 mL d'AF previ a la sembra, i així disminuir la relació entre volum de mostra i de medi.

Per tant, es determina la recuperació de cèl·lules AF-oMSCs emprant dues metodologies de sembra de l'AF (n=7):

A) Sembrada directa de l'AF;

B) Sembrada de l'AF prèviament concentrat per centrifugació.

En ambdós casos, s'observa la presència de cèl·lules de diferents formes i mides així com CFU-Fs després de 4-5 dies de cultiu. Independentment del mètode de sembra de l'AF emprat, es troba al cultiu com a mínim dues poblacions cel·lulars adherents: un grup majoritari amb morfologia fibroblàstica, i un segon grup menys abundant de morfologia poligonal (epitelial) que posteriorment tendeix a desaparèixer al tripsinitzar i ressemar les cèl·lules adherents.

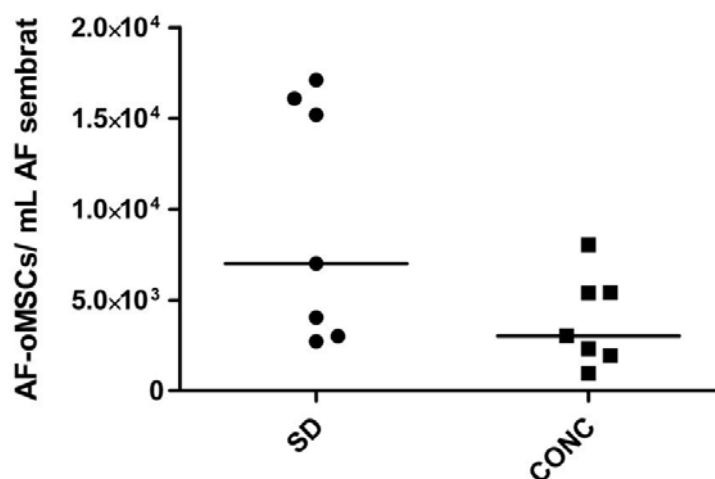


Figura 3.6. Aïllament de cèl·lules mesenquimals estromals mitjançant sembra directa del líquid amniòtic (SD) o a partir del líquid amniòtic prèviament concentrat (CONC).

En tots els líquids amniòtics cultivats es van aïllar CFU-Fs. Després de 10 dies de cultiu, s'obtenia 1,9 vegades (1,0-8,3) major quantitat de cèl·lules adherents quan es feia sembra directa de l'AF respecte a utilitzar l'AF concentrat ($p=0,1282$). Es van recuperar $7,01 \times 10^3$ ($2,73-17,1 \times 10^3$) i $3,02 \times 10^3$ ($0,96-8,04 \times 10^3$) cèl·lules totals per mil·lilitre (mL) d'AF oví sembrat, respectivament (Figura 3.6).

En base a aquests resultats, s'implementa la sembra directa de l'AF en l'etapa d'aïllament de AF-oMSCs .

B) Efecte del temps transcorregut entre la recollida i la sembra del líquid amniòtic en la recuperació cel·lular

Seguidament, s'estudia l'efecte del retard en la sembra de l'AF des del moment de l'obtenció, ja que en la majoria dels casos no és possible processar-lo de forma immediata.

Tal com es mostra a la figura 3.7., mantenint les mostres de l'AF a temperatura ambient, no existeixen diferències significatives en la densitat cel·lular un cop finalitzada l'etapa d'aïllament al comparar sembres fetes en les primeres 4 hores després de l'obtenció de l'AF i entre les 4 - 8 hores ($n=21$, $p= 0,9719$).

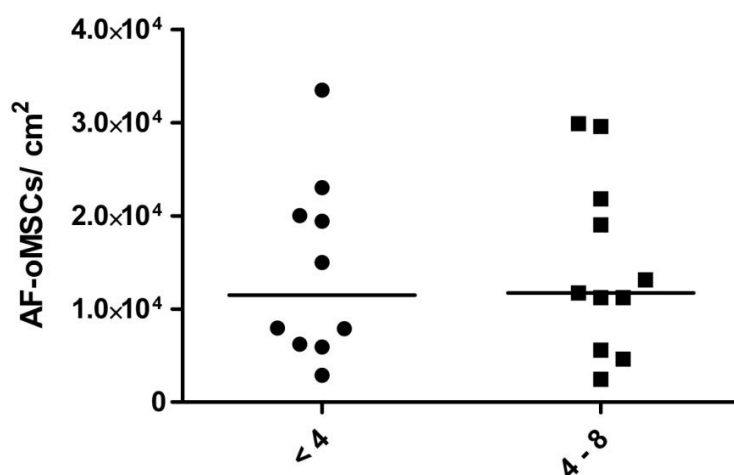


Figura 3.7. Efecte del temps transcorregut entre la recollida i l'inici del processament del líquid amniòtic en la recuperació cel·lular.

C) Efecte de l'edat de l'ovella gestant en la recuperació de cèl·lules mesenquimals

Tal com s'ha esmentat anteriorment, la cirurgia d'inducció del MMC, i per tant, l'obtenció de l'AF, es fa al voltant del dia 75 de gestació. Tot i això, la programació de la cirurgia pot veure's modificada, ja que requereix la presència d'un grup multidisciplinari de professionals (cirurgians pediàtrics, veterinaris, auxiliars,...) i la coincidència amb el personal científic encarregat d'iniciar el cultiu de cèl·lules AF-oMSCs.

És per aquest motiu, que s'examina la correlació entre l'edat de gestació de les ovelles (67-89 dies) i la recuperació cel·lular al finalitzar l'etapa d'aïllament.

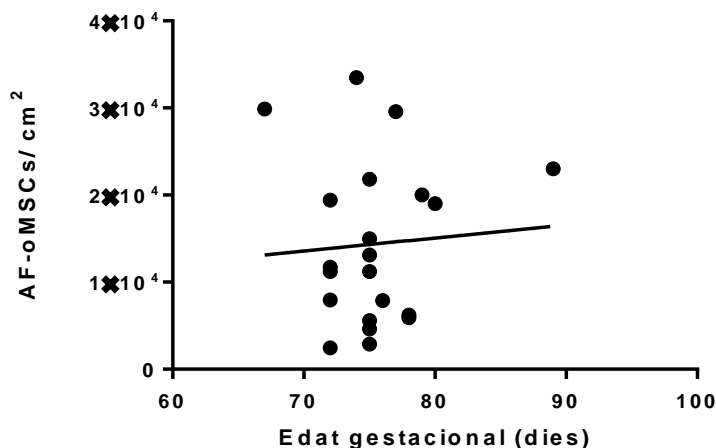


Figura 3.8. Efecte de l'edat de l'ovella gestant en la recuperació de cèl·lules AF-oMSCs entre els dies 67 i 89 de gestació.

Tal com es pot observar en la figura 3.8., l'edat gestacional de l'ovella en el moment de l'obtenció de l'AF no obeeix a un patró lineal respecte a la quantitat de cèl·lules recuperades que indiqui una data preferible en el període estudiat. Per tant, es disposa d'un cert marge en la programació de la cirurgia d'inducció del MMC (r Pearson= 0,068).

3.2.2. OPTIMITZACIÓ DE LES CONDICIONS DE CULTIU PER A LES AF-oMSCs

Una vegada conegut l'efecte de l'edat gestacional de la mare, el mètode per l'obtenció del AF, el temps transcorregut des de l'obtenció de l'AF fins a l'inici del cultiu i definit el protocol de sembra de l'AF, es determinen els paràmetres cinètics de creixement de les AF-oMSCs en presència de diferents medis de cultiu.

Concretament, s'avalua el medi Amniochrome II (medi definit àmpliament utilitzat per estudis citogenètica de mostres d'AF) així com el medi M199 suplementat amb diferents concentracions de sèrum boví fetal (FBS), factor de creixement fibroblàstic bàsic (bFGF) i Amniochrome II tal com es descriu detalladament en *l'apartat 9.4. Expansió de les AF-oMSCs de Materials i Mètodes*. La condició de cultiu A, corresponent a medi M199 suplementat al 10% v/v amb FBS, 5 ng/mL de bFGF i 1X Penicil·lina/Estreptomicina/Amfotericina (Ab/Am) és el medi d'ús habitual pel creixement de MSCs de líquid amniònic segons la literatura i s'anomenarà, a partir d'ara, **medi basal**.

CONDICIÓ	FORMULACIÓ MEDI CULTIU
A	M199 + Ab/Am 1X + 10% v/v FBS + 5 ng/mL bFGF (medi basal)
B	M199 + Ab/Am 1X + 10% v/v FBS + 10 ng/mL bFGF
C	M199 + Ab/Am 1X + 10% v/v FBS + 15% v/v Amnio II
D	M199 + Ab/Am 1X + 10% v/v FBS + 15% v/v Amnio II + 5 ng/mL bFGF
E	M199 + Ab/Am 1X + 20% v/v FBS + 15% v/v Amnio II
F	Amnio II + Ab/Am 1X

Taula 3.1. Disseny experimental per avaluar diferents medis de cultiu pel creixement de les AF-oMSCs (Densitat de sembra= 2×10^3 cèl·lules vives/cm²; flascó T25; mantingudes durant 7 dies, fent recanvis a dia 2 i 5).

El primer experiment té com a objectiu estudiar el grau d'expansió cel·lular en presència de les diferents formulacions de medi durant 7 dies de cultiu i amb recanvis de medi fresc cada 2-3 dies.

La densitat cel·lular assolida és de $2,10 \times 10^4$ ($1,50-2,16 \times 10^4$) i $2,20 \times 10^4$ ($1,65-2,22 \times 10^4$) cèl·lules/cm² per ambdues concentracions de bFGF assajades, 5 ng/mL vs 10 ng/mL ($p=0,400$).

En referència al FBS com a suplement de cultiu, la densitat cel·lular final si el medi es suplementa amb el 10% v/v d'FBS és de $3,24 \times 10^4$ ($1,75-7,25 \times 10^4$), i de $3,06 \times 10^4$ ($2,42-10,00 \times 10^4$) cèl·lules/cm² utilitzant el 20% v/v de FBS ($p=1,000$).

Per tant, els resultats suggereixen que l'augment de la concentració de bFGF o FBS en el cultiu no té un impacte rellevant en la quantitat de cèl·lules obtingudes.

En canvi, el medi Amniochrome II (condició F) exhibeix un índex de proliferació major. Utilitzant aquest medi, la densitat final del cultiu augmenta 2,27 (1,53-3,43) vegades en comparació a medi basal (condició A), i 1,02 (1,02-1,93) vegades o 1,15 (0,70-1,19)-vegades en comparació a les formulacions amb concentracions intermitges d'Amniochrome II, contretament les condicions C i D, respectivament ($p_{A-F}=0,100$; $p_{C-F}=0,400$; $p_{D-F}=0,700$).

A partir dels resultats anteriors, s'analitzen les cinètiques de creixement associades al medi basal i l'Amniochrome II ja que corresponen als patrons de creixement extrems. La velocitat de creixement màxima (μ_{max}) i el temps de duplicació (t_d) de les AF-oMSCs ($n=3$) es calcula a partir de les dades obtingudes en diferents temps de les corbes de creixement portades a terme sense recanvi de medi fresc.

Per els dos medis testats, la corba de creixement mostra una fase de latència d'aproximadament un dia, la fase exponencial dura uns 4 dies i a continuació s'entra en la fase plateau o d'aturada del creixement (Figura 3.9).

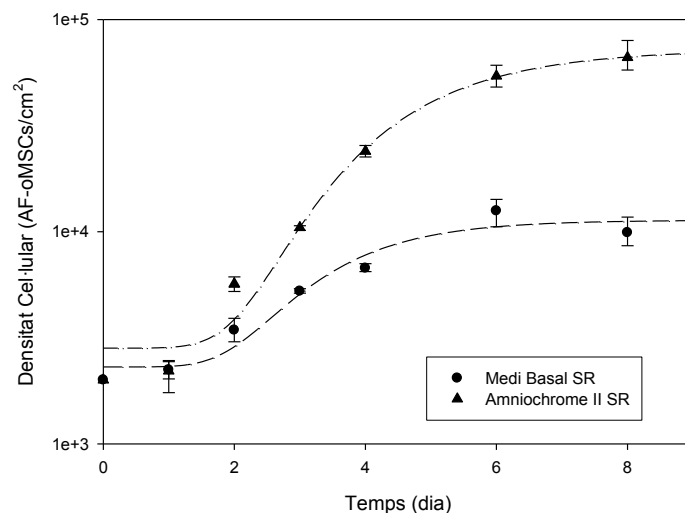


Figura 3.9. Corbes de Creixement de AF-oMSCs cultivades amb medi basal (M199) i Amniochrome II sense recanvi de medi fresc (SR).

Pels cultius de cèl·lules amb medi basal, la μ_{max} calculada és de 0,43 (0,37-0,44) dies⁻¹, en canvi, és 0,79 dies⁻¹ (0,63-0,82) en presència de medi de cultiu Amniochrome II ($p=0,100$). Respecte al t_d cel·lular corresponent, és de 1.60 dies (1,57-1,88) i 0,87 dies (0,85-1,10), respectivament. La densitat cel·lular final assolida va ser de 1.07×10^4 cell/cm² ($0,92-1,35 \times 10^4$) en medi basal i $6,37 \times 10^4$ cell/cm² ($3,70-8,98 \times 10^4$) en presència d'Amniochrome II ($p=0,100$).

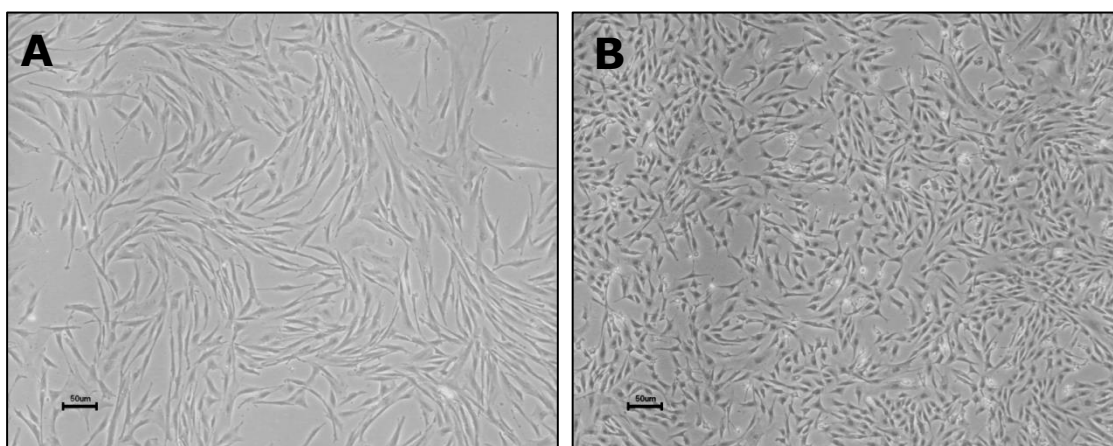


Figura 3.10. Aspecte microscòpic de les AF-oMSCs 712 P4 cultivades amb medi basal (A) o Amniochrome II (B). Les AF-oMSCs cultivades en medi Amniochrome II són més petites i menys allargades que les crescudes en medi basal.

Finalment, cal destacar que la mida de les cèl·lules és remarcablement menor quan les cèl·lules són cultivades en medi Amniochrome II en comparació al medi basal (Figura 3.10.).

Per tal de confirmar aquest comportament, es cultiva l'AF des de la sembra inicial de forma paral·lela amb aquests dos medis de cultiu, i s'analitza el seu patró de creixement al llarg de 5 passis consecutius. Tal com es mostra en la següent figura, la velocitat de creixement és molt més elevada quan cultivem les cèl·lules amb Amniochrome II, la qual cosa es tradueix en una major acumulació del nombre de duplicacions al llarg de les consecutives etapes d'expansió.

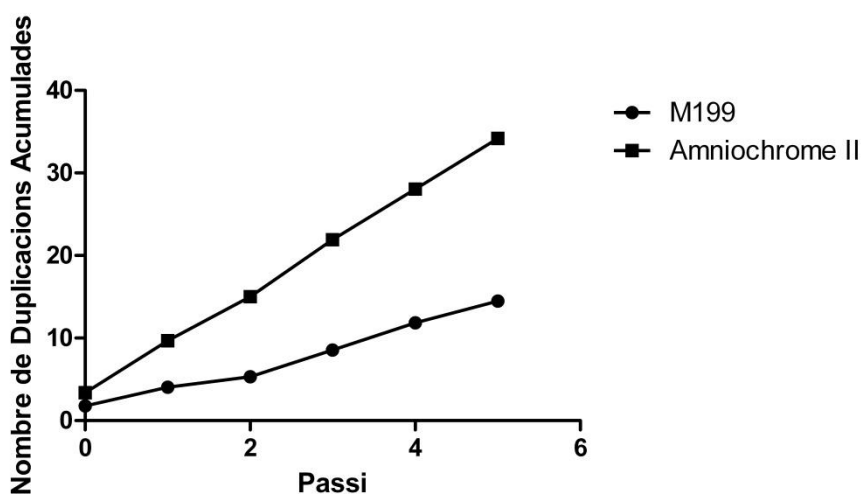


Figura 3.11. Patró de creixement de les AF-oMSCs en presència de medi basal (A) o Amniochrome II (B) al llarg de 5 passis consecutius.

Tenint en compte els punts que es descriuen a continuació, i que es discuteixen en més profunditat en l'apartat 3.3. *Discussió de resultats i conclusions* d'aquest mateix capítol, es decideix utilitzar el medi basal per les expansions cel·lulars de les AF-oMSCs que s'utilitzaran en el model oví del MMC:

- 1) En base a la quantitat d'AF-oMSCs obtingudes per mL d'AF sembrat després de l'etapa d'aïllament ($2,73-17,1 \times 10^3$ cèl·lules/mL) i a la μ_{max} associada a les AF-oMSCs cultivades en medi basal ($0,37-0,44$ dies⁻¹), podem assolir la dosi clínica fixada en $2-4 \times 10^6$ AF-oMSCs vives utilitzant aquest medi de cultiu.
- 2) Cultivant les AF-oMSCs en medi Amniochrome II es preveu superar les 20 duplicacions en les tres setmanes que aproximadament dura el cultiu ($td=0,85-1,10$ dies).
- 3) El cost del medi Amniochrome és unes 3,5 vegades més elevat que el medi basal.

En el següent grup d'experiments s'estudia l'efecte dels recanvis de medi basal fresc en el creixement cel·lular ($n=3$). Tal com es mostra en la Figura 3.12, alimentar el cultiu amb medi basal fresc cada 3 dies resulta en una perllongació del creixement de 4 a 6 dies. Després d'aquest temps, la proliferació de les cèl·lules AF-oMSCs tendeix a estancar-se, indicant inhibició per contacte per alta confluència de les cèl·lules.

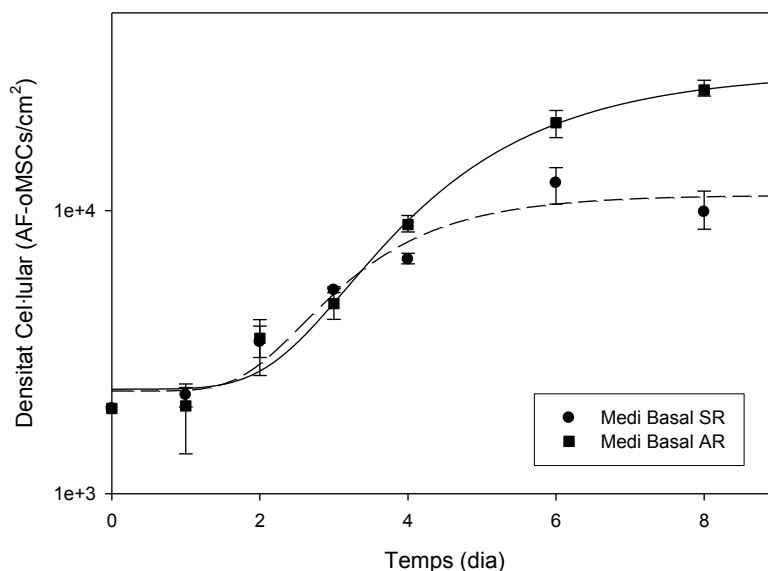


Figura 3.12. Patró de creixement de les AF-oMSCs cultivades en medi basal amb (AR) o sense (SR) recanvis de medi fresc.

Les dades obtingudes de les corbes de creixement mostren una densitat final de $3,24 \times 10^4$ cèl·lules/cm² ($2,32-4,54 \times 10^4$) utilitzant l'estratègia de recanvis de medi fresc respecte a $1,09 \times 10^4$ cèl·lules/cm² ($1,05-1,18 \times 10^4$) sense alimentar el cultiu, la qual cosa significa triplicar el valor d'aquest paràmetre ($p=0,100$).

3.2.3. ASSAIG D'UNITATS FORMADORES DE COLÒNIES FIBROBLÀSTIQUES

Es determina la feqüència d'unitats formadores de colònies fibroblàstiques (CFU-Fs) presents en set mostres de AF oví. Després de 10 dies en cultiu de l'AF en medi basal es tenyeixen i recompten 1,4 (0,5-17,5) CFU-Fs per cada 10^5 cèl·lules de AF sembrades, el que suggereix que la feqüència de MSCs en les mostres de AF oví es troba entre $1/10^4$ i $1/10^5$ cèl·lules totals.

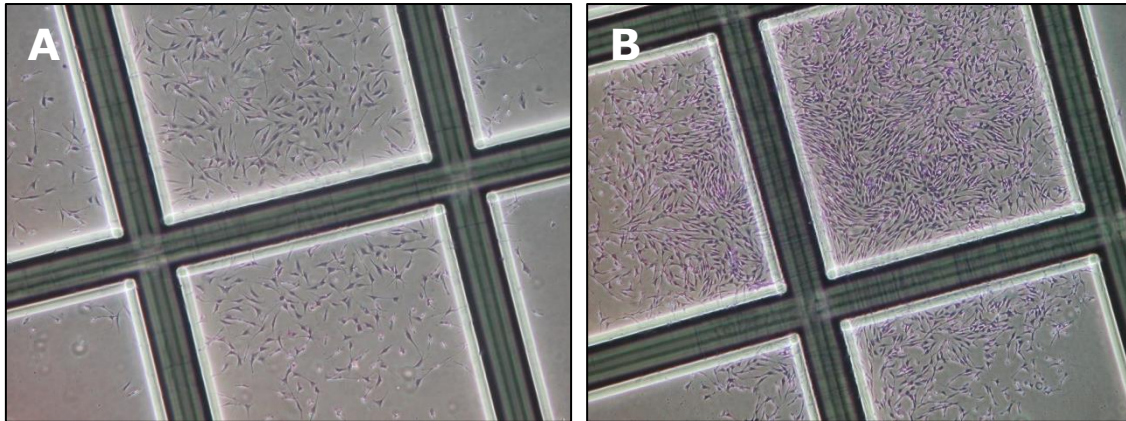


Figura 3.13. Imatges de CFU-Fs del AF 3639, després de 10 dies en cultiu a menor (A) i major (B) densitat cel·lular.

3.2.4. CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DE LES AF-oMSCs

Per ampliar la caracterització de les cèl·lules AF-oMSCs aïllades i expandides, s'examina l'expressió de diverses proteïnes de membrana mitjançant citometria de flux en 7 línies cel·lulars expandides entre els passos 0 i 3.

De forma general, les AF-oMSCs no mostren expressió de marcadors hematopoètics com CD45 or HLA-DR, o de marcadors endotelials com el CD31, mentre que més del 90% de les cèl·lules exhibeixen expressió positiva de marcadors típicament presents en cèl·lules MSCs, com són el CD44 i el CD166 (Figura 3.14).

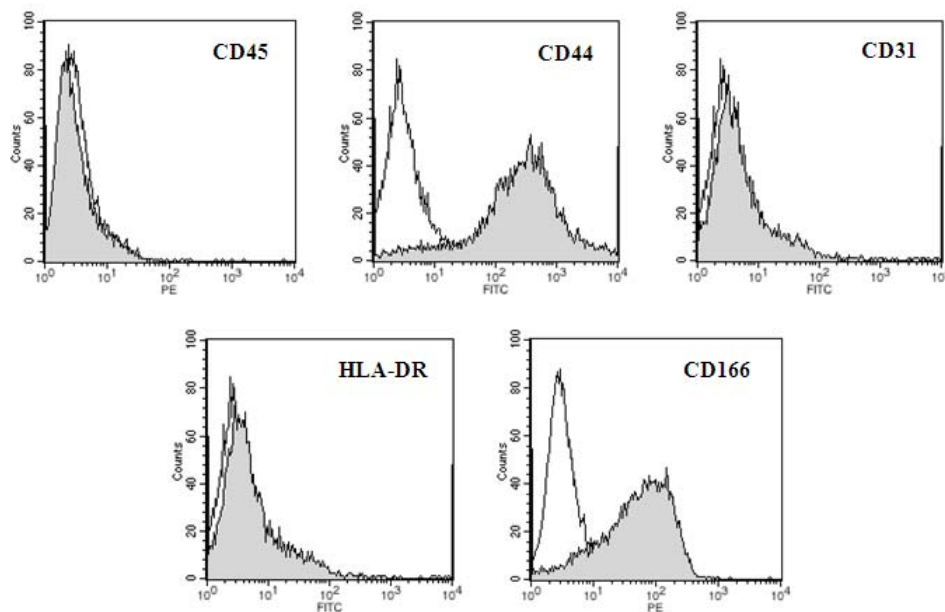


Figura 3.14. Exemple de caracterització immunofenotípica de AF-oMSCs 712 P1 pels marcadors CD45, CD44, CD31, CD166 i HLA-DR.

Per altra banda, destacar el fet que no s'ha obtingut resposta utilitzant la resta de marcadors amb especificitat per l'espècie humana (CD105, CD90, CD73 i CD117). Concretament, no s'han observat poblacions amb expressió positiva en la mostra de sang perifèrica d'ovella (control positiu) i la diferència en la intensitat de fluorescència entre l'isotip i la mostra de AF-oMSCs és mínima. En conseqüència, es considera que els marcadors avaluats no mostren reactivitat creuada amb l'espècie ovina i, per tant, la seva utilització no és apropiada per complementar la caracterització fenotípica de les AF-oMSCs.

3.2.5. CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE LES AF-oMSCs

El potencial de diferenciació de les AF-oMSCs expandides s'ha assajat *in vitro* cultivant les cèl·lules amb medis de diferenciació comercials osteogènic, condrogènic i adipogènic. Com a control negatiu, s'han cultivat en paral·lel al cultiu de diferenciació les AF-oMSCs en medi basal.

3.2.5.1. Diferenciació Osteogènica

Tal com es mostra en la figura 3.15., la capacitat de diferenciació osteogènica s'ha confirmat per la deposició de sals de calci rebel·lada amb la Tinció Von Kossa, després de 4 setmanes d'exposició al medi de diferenciació (n=5).

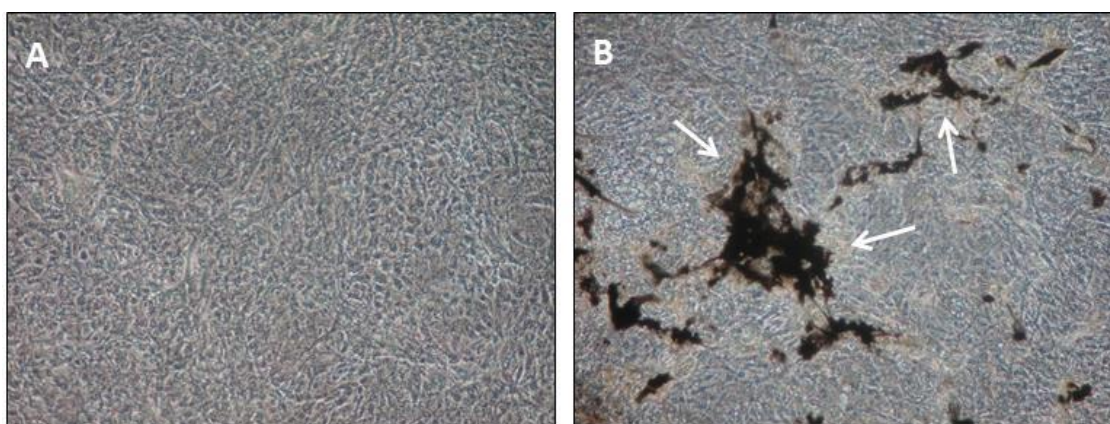


Figura 3.15. Diferenciació osteogènica de oAF-MSCs 106 detectada mitjançant Tinció de Von Kossa a 40X augments: Control (A) i mostra diferenciada (B). Les sals de calci adopten una coloració marró-negra després de la Tinció Von Kossa (fletxes blanques).

3.2.5.2. Diferenciació Condrogènica

La diferenciació condrogènica ha estat verificada mitjançant l'anàlisi dels talls histològics del micromass pellet. Inicialment, l'obtenció de talls histològics a partir del micromass pellet per dur a terme la tinció de Blau Alcà ha estat difícil. Després de diversos intents s'ha observat que preparar el micromass pellet amb un

mínim de 1×10^6 AF-oMSCs perquè l'estructura sigui prou consistent alhora de fer els talls.

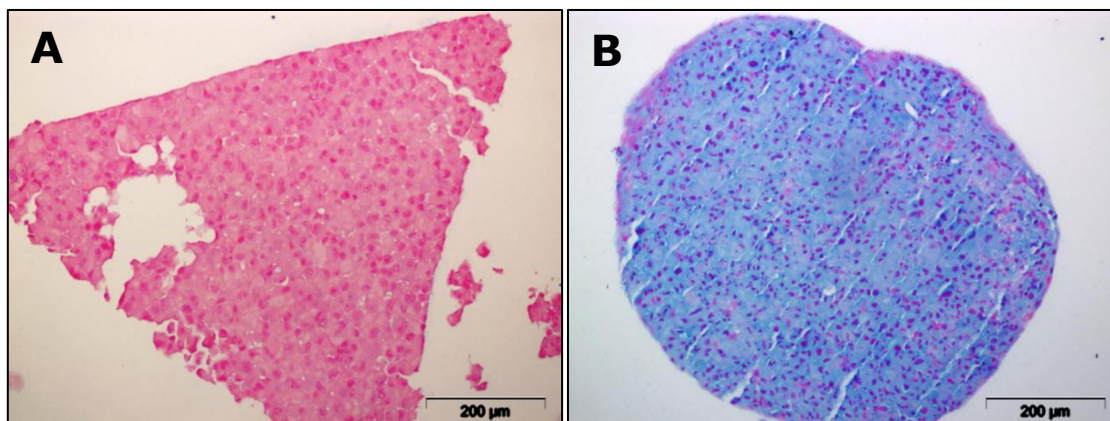


Figura 3.16 . Tinció dels glucosaminoglicans presents al micromass pellet mitjançant Blau Alcian després de l'assaig de diferenciació a llinatge condrogènic d'AF-oMSCs 22066: Control (A,) i mostra diferenciada (B) en la que s'observa que els glucosaminoglicans adquireixen la coloració blava característica.

En les mostres sotmeses al protocol de diferenciació condrogènica, les cèl·lules tenen citoplasma abundant i s'evidencia la producció de matriu extracel·lular. A més, tant la matriu extracel·lular com la matriu citoplasmàtica són positives per a la tinció de Blau Alcian, el que suggereix la presència de glucosaminoglicans característics del teixit cartilaginós (n=5, Figura 3.16.).

3.2.5.3. Diferenciació Adipogènica

La capacitat de diferenciació adipogènica de les AF-oMSCs es demostra cultivant-les amb medi de diferenciació específic, que condueix a l'acumulació de vacuoles lipídiques i que adopten coloració vermella a l'emprar la tinció Oil Red.

En tots els assajos s'ha fet evident la modificació de la morfologia de les cèl·lules de fibroblàstica a més arrodonida en les mostres amb medi de diferenciació i en alguns casos fins i tot s'ha observat alta mortalitat cel·lular.

Finalment, és important destacar que la presència de vacuoles lipídiques s'ha pogut observar únicament en 2 de les 10 línies cel·lulars avaluades (Figura 3.17.), inclús havent augmentat el temps d'inducció fins a 4 setmanes.

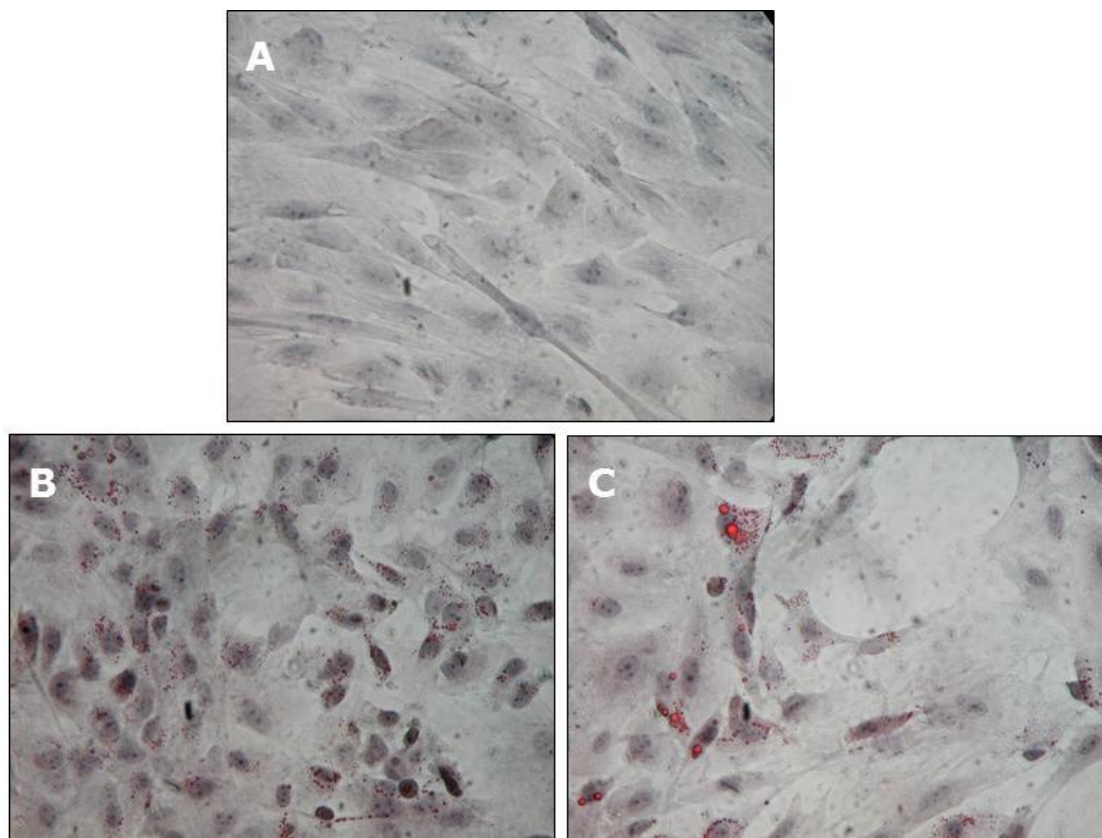


Figura 3.17. Tinció de les gotes lipídiques situades al citoplasma de les AF-oMSCs de la línia F101 mitjançant tinció de Red Oil una vegada finalitzat el temps d'inducció en medi de diferenciació Adipogènica: A) Control; B i C) Mostra.

3.2.6. PRODUCCIÓ DE AF-oMSCs A DOSI CLÍNICA

A partir de la metodologia definida en els apartats anteriors, i tal com es descriu en l'*apartat 9.5. de material i mètodes*, s'estableix un procediment normalitzat de treball que permet assegurar la reproductibilitat del procés i està compost per una primera etapa d'aïllament seguida de l'expansió de AF-oMSCs amb l'objectiu d'obtenir les cèl·lules suficients per ser utilitzades posteriorment en la reparació del MMC en combinació amb diferents tipus de biomaterials.

Es recullen 90,5 (83,0 – 98,0) mL de AF procedent d'ovelles a 75 (67-89) dies de gestació (n=12). Del volum anterior, 80 mL de AF es sembren directament a una relació de 0,27 mL de AF per cm². S'observa la presència d'unitats fibroblàstiques formadores de colònies en tots els cultius. Tot i així, la quantitat de CFU-Fs varia considerablement entre cultius, des de 5 fins a 25 per flascó de cultiu.

A dia 10, les cèl·lules adherents es tripsinitzen i es recompten. Es recuperen $9,13 \times 10^5$ ($1,97 - 26,8 \times 10^5$) cèl·lules fibroblàstiques al 97,0% (75,9-99,0) de viabilitat. La densitat cel·lular final assolida és de $3,04 \times 10^3$ cèl·lules/cm² (0,65-8,93

$\times 10^3$), el que correspon a $1,14 \times 10^4$ ($0,25-3,35 \times 10^4$) cèl·lules per mL de AF sembrat.

Les cèl·lules aïllades es ressemblen en nous flascons de cultiu per tal d'expandir-les. Per tal d'harmonitzar l'escalat, es manté la densitat de sembra en tots els cultius modificant la superfície de cultiu en funció de les cèl·lules obtingudes en l'etapa d'aïllament. Concretament, la densitat real de sembra és de $2,96 \times 10^3$ ($2,82-3,09 \times 10^3$) AF-oMSCs/cm² (n=9) i utilitzant una superfície cultiu des de 75 fins a 300 cm². Després de 6-7 dies de cultiu i fent recanvis de medi fresc cada 3 dies, s'assoleix una densitat cel·lular de $1,85 \times 10^4$ AF-oMSCs/cm² ($0,93-7,97 \times 10^4$), i una dosi cel·lular total de $3,83 \times 10^6$ ($1,30-18,7 \times 10^6$) AF-oMSCs a una viabilitat del 98,0% (97,0-100,0).

3.3. DISCUSSIÓ DE RESULTATS I CONCLUSIONS

En aquest capítol, s'ha exposat la posada al punt de l'aïllament i expansió de MSCs procedents de AF oví per tal d'obtenir una dosi cel·lular específica compresa entre $2-4 \times 10^6$ AF-oMSCs, en un període de temps aproximat de tres setmanes, independentment de la variabilitat entre mostres biològiques.

En els primers experiments, en què l'AF s'ha obtingut per aspiració un cop la paret de l'úter es troba ja oberta, l'aïllament de les AF-oMSCs és molt pobre, la qual cosa compromet l'èxit d'expansió. Una possible explicació per aquests resultats indesitjats podria ser la presència d'una gran quantitat d'eritròcits en els cultius, que provenen de la contaminació de l'AF a l'obrir la paret uterina i que podrien influir negativament en l'aïllament i creixement de les cèl·lules adherents de l'AF (90). Per tal d'evitar la contaminació hematopoètica, les mostres d'AF s'han recollit mitjançant punció a través de la paret de l'úter en els següents experiments.

Per tal d'establir el protocol per a l'etapa d'aïllament de les AF-oMSCs, s'ha avaluat la sembra de les cèl·lules des de dues aproximacions experimentals: sembra directa i centrifugació de l'AF. Resulta interessant el fet que la concentració cel·lular inicial per centrifugació dona lloc a una pèrdua que es tradueix, en la primera etapa del cultiu, en menor rendiment d'aïllament de AF-oMSCs. La sembra directa de l'AF sense manipulacions, a més, permet iniciar el cultiu de forma més ràpida i amb un menor cost associat.

L'observació dels cultius ha posat de manifest la presència de tipus cel·lulars adherents amb diferents morfologies en el AF oví, aquesta observació concorda amb els treballs prèviament publicats sobre cultius d'AF humà (81, 91, 92).

Una vegada escollit el millor protocol per l'aïllament de les cèl·lules d'interès, s'han avaluat diferents medis de cultiu, entre ells el medi basal i l'Amniochrome II, tenint en compte que l'objectiu del treball és obtenir una dosi de $2-4 \times 10^6$ AF-oMSCs viables en un període aproximat de tres setmanes. Tot i que els resultats obtingut indiquen clarament que qualsevol dels medis suplementats avaluats permetien arribar a la dosi clínica, el medi Amniochrome II s'ha considerat poc adequat a causa de l'alt número de duplicacions cel·lulars associades després de 21 dies de cultiu (23,3 duplicacions pel medi Amniochrome II vs. 13,1 utilitzant el medi basal). En concordança amb aquests resultats, s'ha reportat que l'acumulació de duplicacions de les cèl·lules en cultiu podria estar associada a fenòmens d'inestabilitat cromosòmica i senescència (93, 94) així com de pèrdua de multipotencialitat (95).

En cas de voler mantenir el número de duplicacions per sota de 20 utilitzant el medi Amniochrome II, caldria una etapa de criopreservació prèvia a la implantació de les cèl·lules, la qual cosa introduiria més variabilitat i complexitat al procés. És per aquest motiu que la utilització del medi Amniochrome II es considera més apropiat per aplicacions en les que es requereix una dosi cel·lular més alta, com regeneració d'os i cartílag en grans articulacions, l'esclerosi múltiple o la malaltia de de l'empelt contra l'hoste (96-100).

Per tant, a partir del coneixement adquirit en aquest primer grup d'experiments sobre els paràmetres cinètics de les AF-oMSCs (velocitat màxima de creixement, temps de duplicació,...) cultivades en medi basal, podem assegurar la dosi cel·lular per a cadascun dels animals, fixant la densitat de sembra i coneixent el temps total de cultiu determinat per la data específica de la cirurgia de reparació del MMC.

Per altra banda, és important apuntar que els recanvis de medi basal fresc cada 3-4 dies, no només permeten allargar la fase de creixement, sinó que eviten la limitació de nutrients (associada a fenòmens d'inducció de l'apoptosi) i permeten l'eliminació dels subproductes del metabolisme cel·lular, com ara el lactat o l'amoni, i que poden exercir un efecte inhibitori sobre el creixement (101).

En concordança amb altres treballs fets en model oví (102, 103), les cèl·lules fibroblàstiques aïllades i expandides exhibeixen el perfil immunofenotípic de les cèl·lules MSCs, concretament s'ha demostrat que presenten expressió positiva pels receptors CD44 i CD166, i són negatius pels marcadors hematopoètics i endotelials CD45, HLA-DR i CD31. La identificació i purificació de MSCs d'espècies de mamífers diferents a les humanes es dificulta per la manca d'anticossos monoclonals específics. Actualment, estan emergint nous anticossos monoclonals amb reactivitat creuada per a diferents espècies animals utilitzades en models animals de medicina regenerativa (104). De fet, s'han provat anticossos contra marcadors de superfície específics per MSCs humanes tals com el CD105 (clon SN6), CD90 (clon 5E10 i F15-42-1-5), i CD117 (clon 104D2) i no han presentat reactivitat per les AF-MSCs ovines, la qual cosa ha limitat la caracterització de les cèl·lules segons els criteris establerts per la *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) (105).

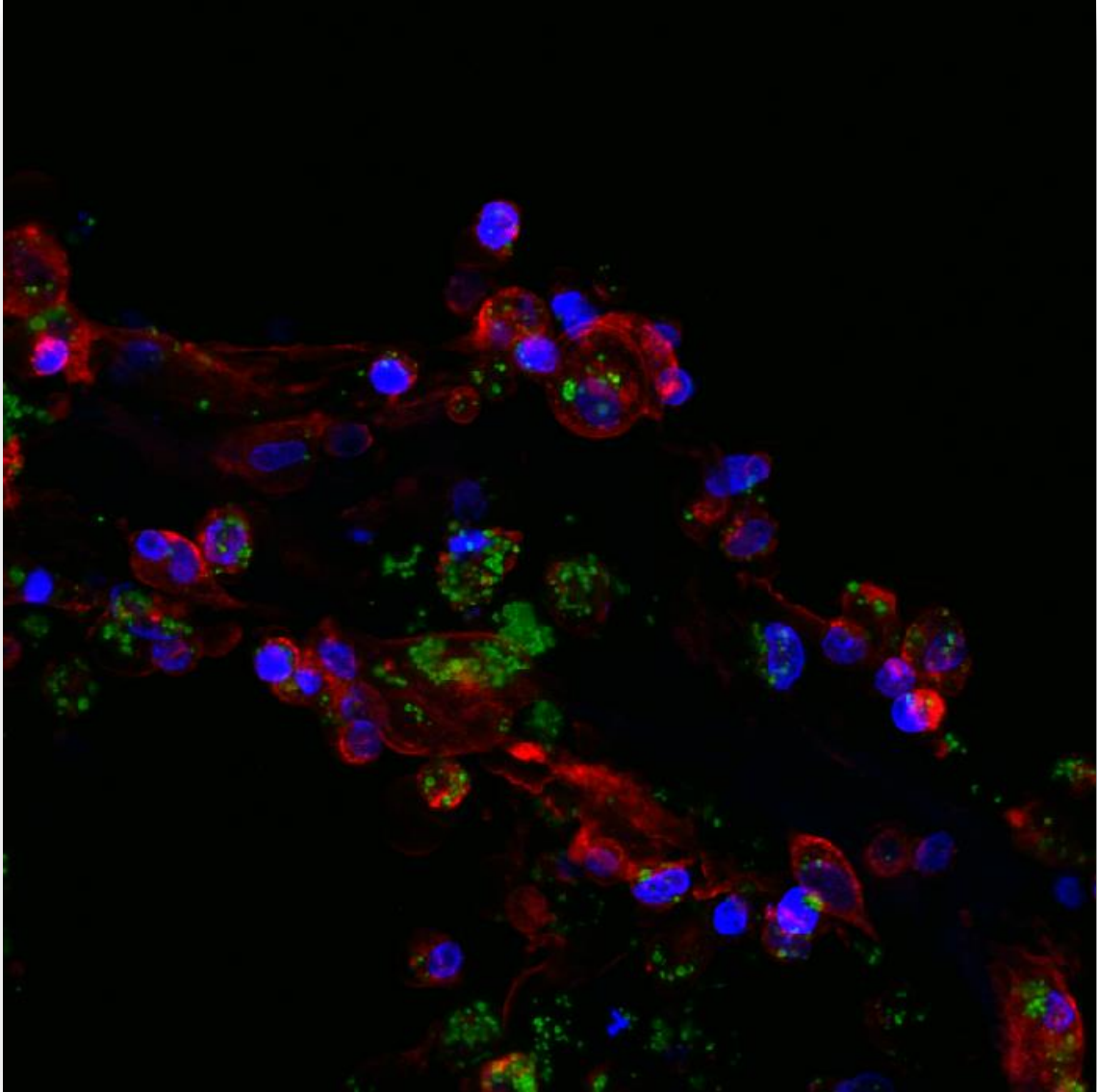
Aquesta informació és d'interès sobretot tenint en compte que la informació publicada d'aquest tipus cel·lular és limitada (102, 103, 106).

Els experiments, a més, han evidenciat la capacitat de diferenciació *in vitro* de les AF-oMSCs a llinatges condrogènic i osteogènic. Contràriament, la diferenciació adipogènica ha resultat més limitada. Aquesta observació es correspon amb altres

treballs, en què s'ha reportat la dificultat de demostrar el potencial de diferenciació adipogènica de les MSCs procedents de teixits extraembrionaris (107).

Diversos factors com la font, el medi de cultiu utilitzat, la presència de sèrum animal i altres factors de creixement, la densitat cel·lular o el nombre de passis tenen un impacte significatiu en la multipotencialitat de les cèl·lules (85, 86, 108-110). És àmpliament acceptat que les MSCs són una població cel·lular heterogènia (110). Els resultats obtinguts suggereixen que, amb les condicions de cultiu utilitzades, es selecciona una població que com a mínim presenta bipotencialitat osteo-condrogènica (111).

El coneixement de la cinètica de creixement de les AF-oMSC, així com l'efecte de les condicions de cultiu en la proliferació i potència de les cèl·lules, és important no només per a la recerca preclínica en models animals experimentals, sinó també per a la producció cel·lular per a ús clínic. En els següents capítols, s'implementarà el procediment normalitzat de treball presentat per tal d'assajar el valor terapèutic *in vivo* del producte cel·lular generat en combinació amb diferents tipus de biomatrius en el model oví de Mielomeningocele.



CAPÍTOL 4:
MARCATGE I SEGUIMENT DE LES AF- α MSCs
MITJANÇANT MICROPARTÍCULES D'ÒXID DE FERRO

4.1. INTRODUCCIÓ

En el model animal utilitzat en aquest treball, l'administració de les AF-oMSCs es fa de forma local a la zona de reparació del MMC del fetus oví a través de la implantació dels diferents tipus de constructes que es volen avaluar.

El comportament de les cèl·lules (localització, proliferació, diferenciació i/o possible migració), així com l'efecte de la seva presència en el lloc de la lesió, són paràmetres crítics per avaluar l'eficàcia terapèutica dels productes d'enginyeria tissular. El marcatge i seguiment de les AF-oMSCs en el model animal, per tant, obre les portes a conèixer els mecanismes i cinètica de la regeneració cel·lular mediada per aquestes cèl·lules (112).

Existeixen diferents estratègies per dur a terme el marcatge i seguiment de les MSCs com: marcadors de bioluminescència, sondes fluorescents, anàlegs de la timidina (com per exemple, la 5-bromo-2'-deoxiuridina o BrdU), transfecció amb gens que codifiquin per proteïnes fluorescents (com la proteïna verda fluorescent o GFP), marcatge magnètic amb micro/nanopartícules d'òxid de ferro, etc. (113, 114). En funció del tipus de marcador escollit, el seguiment de les cèl·lules serà possible durant un període més o menys extens de temps. A més, cada marcador presenta un grau de toxicitat a valorar.

Les micropartícules d'òxid de ferro (MPIOs) són utilitzades en el camp mèdic en un gran ventall d'aplicacions com ara biosensors, separació cel·lular, administració de medicaments contra el càncer, etc. (115, 116). Els efectes biològics del marcatge de MSCs amb MPIOs han estat àmpliament estudiats en els últims anys. Diversos grups han demostrat que no es modifica la morfologia de les MSCs en cultiu i tampoc s'inhibeix la proliferació cel·lular (117). Per altra banda, també s'ha reportat el manteniment de la multipotencialitat en estudis de diferenciació a llinatges mesodèrmics *in vitro* (118, 119) i de la capacitat de regeneració tissular *in vivo* (120).

Amb tot, les característiques de les MPIOs les fan un marcador elegible per als estudis pre-clínic amb teràpies cel·lulars basades en MSCs. A més, poden ser utilitzades com a agents de contrast per a la detecció no-invasiva de les cèl·lules marcades en imatges de ressonància magnètica nuclear (RMN) (121).

En aquest capítol, es pretén desenvolupar el procediment pel marcatge de les AF-oMSCs utilitzant una suspensió de MPIOs fluorescents amb una mida de 1.63 (1.00-1.99) μm , i conjugades amb Dragon Green. El fet que les MPIOs estiguin conjugades amb aquest marcador fluorescent (480, 520 nm), no només permet

verificar la internalització de les MPIOs per Microscòpia de Fluorescència, sinó també quantificar les cèl·lules marcades mitjançant tècniques de Citometria de Flux. A tal efecte, es dissenyaran les plantilles i els *settings* específics per l'adquisició i anàlisi de les AF-oMSCs marcades al citòmetre de flux.

Per altra banda, diversos fenòmens poden donar lloc a la dilució de les MPIOs, com són la proliferació i migració de la cèl·lules marcades o la biodegradació de les MPIOs (122). Per aquest motiu, un cop coneguda la concentració òptima de marcatge *in vitro*, s'estudiarà si les MPIOs persisteixen a l'interior de les AF-oMSCs en cultiu de forma estable o, si pel contrari, es perden ràpidament. Aquesta informació ens pot donar idea del manteniment del marcatge una vegada les AF-oMSCs siguin administrades *in vivo*.

Les tècniques que es proposa utilitzar per detectar les AF-oMSCs en la zona de reparació del MMC dels nounats ovins són la Tinció de PERL's i la RMN. Tinció de PERL's, és una tinció específicament dissenyada per detectar dipòsits de ferro en mostres de teixit parafinades (123). La RMN permetria la monitorització de la biodistribució i migració de les AF-oMSCs marcades en el nounat oví viu.

Tenint en compte, que la intensitat de senyal en la RMN està directament relacionada amb la quantitat de MPIOs intracel·lular en les cèl·lules viables (122), es faran estudis de detecció d'AF-oMSCs amb un baix contingut de MPIOs. D'aquesta manera, s'intentarà assegurar la detecció de les AF-oMSCs marcades mitjançant RMN al final de la gestació.

4.2. RESULTATS

4.2.1. DEFINICIÓ INICIAL DEL PROTOCOL MARCATGE DE AF-oMSCs AMB MPIOs

El primer experiment d'aquest capítol va adreçat a establir les condicions inicials del protocol de marcatge de les AF-oMSCs amb MPIOs. Concretament, s'estudia l'efecte de la utilització de concentracions creixents de MPIOs (concretament, de 25 fins a 500 MPIOs/AF-oMSC) en el grau de marcatge de les AF-oMSCs.

Tal com es descriu en *l'apartat 9.9.1 de Materials i Mètodes*, es marquen quatre línies cel·lulars diferents que es troben a una densitat en cultiu de 3×10^4 AF-oMSCs per cm^2 , ja que és la densitat cel·lular esperada al final de l'etapa d'expansió segons les dades obtingudes en el capítol anterior.

Després del període d'incubació de les AF-oMSCs amb les MPIOs, es comprova la presència de les nanopartícules a l'interior del citoplasma cel·lular per microscòpia confocal de fluorescència (Figura 4.1.). Les AF-oMSCs mantenen la seva capacitat d'adherència al plàstic, la morfologia cel·lular continua sent fibroblàstica i s'observa que les MPIOs dins les AF-oMSCs s'acumulen al citoplasma cel·lular i amb distribució perinuclear (Figura 4.1; fletxes vermelles).

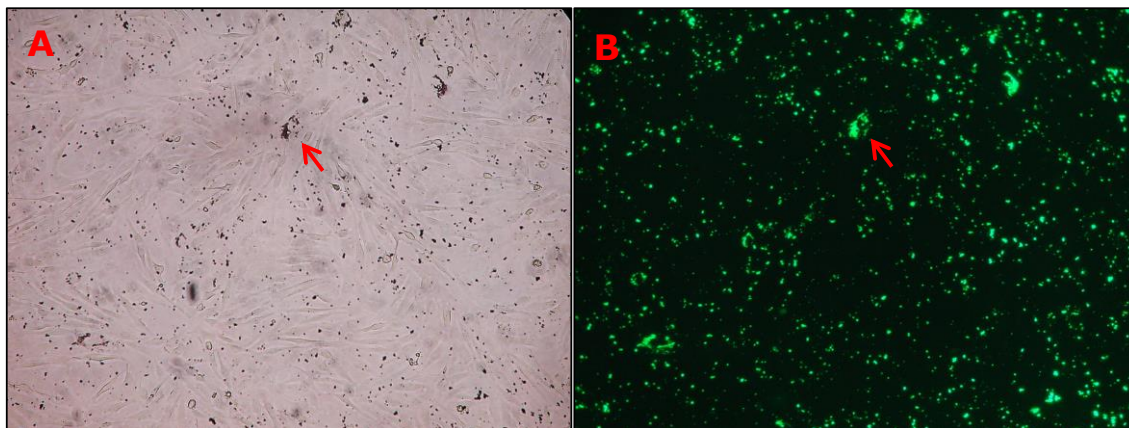
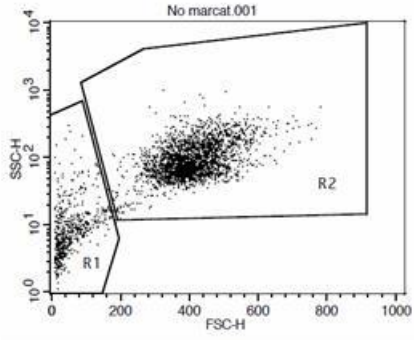


Figura 4.1. Observació microscòpica d'AF-oMSCs marcades de la línia cel·lular F122 P2 després de 24h d'incubació amb 50 MPIOs per AF-oMSCs (4X); A) Microscòpia òptica i B) Microscòpia de Fluorescència.

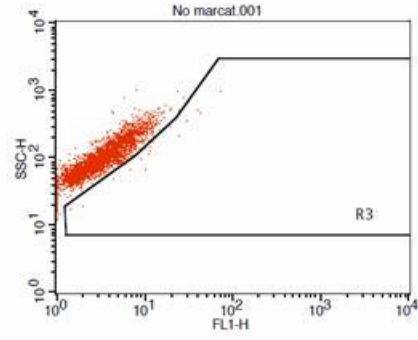
Seguidament, i un cop tripsinitzades les cèl·lules, es determina el percentatge de AF-oMSCs marcades mitjançant citometria de flux.

El primer pas és identificar la població d'interès. Tot i no haver observat canvis apreciables en la morfologia de les AF-oMSCs en cultiu, una vegada en suspensió i observant-les en l'histograma SSC/FSC si que es detecten modificacions substancials dels paràmetres intrínsecs.

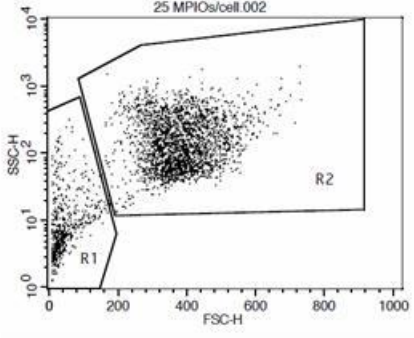
A.1.



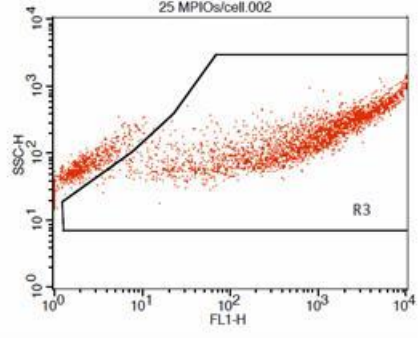
A.2.



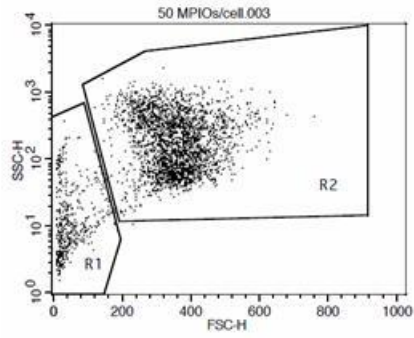
B.1.



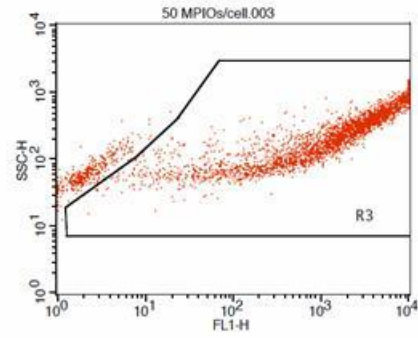
B.2.



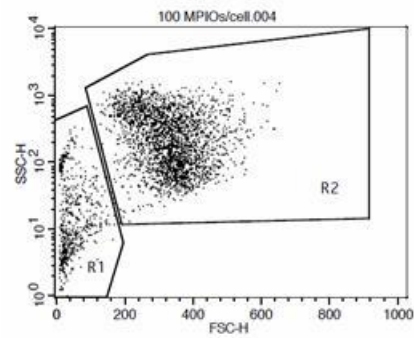
C.1.



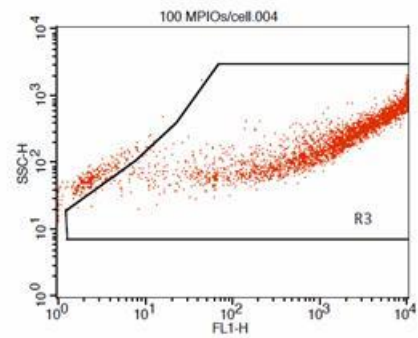
C.2.



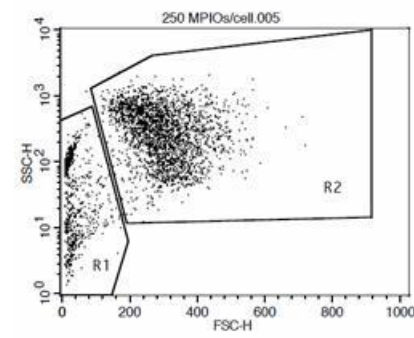
D.1.



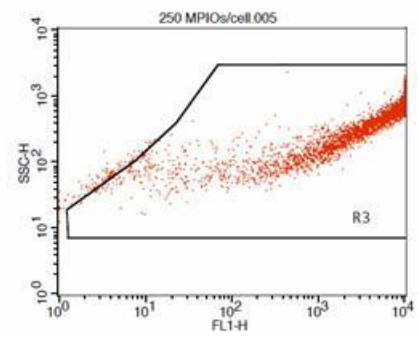
D.2.



E.1.



E.2.



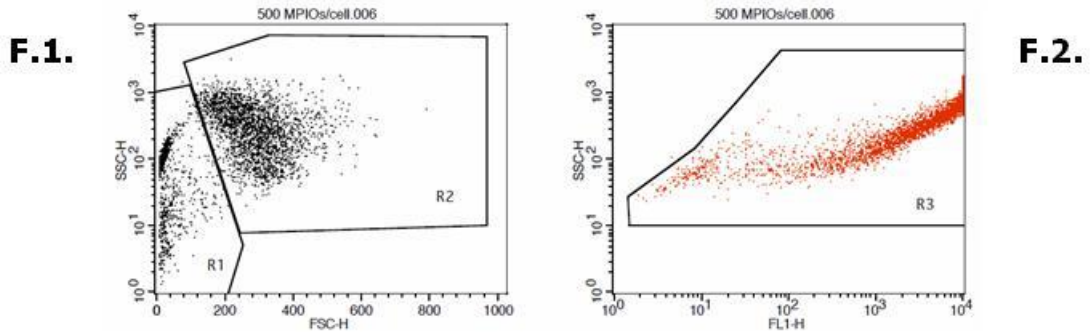


Figura 4.2. Imatges citomètriques corresponents a les AF-oMSCs sense marcar (A) i marcades amb 25 (B), 50 (C), 100 (D), 250 (E) i 500 (F) MPIOs/AF-oMSC. En el primer histograma (1) es delimita la població d’interès (R2) i en el segon histograma (2) es determina el percentatge de cèl·lules marcades R3.

Les AF-oMSCs marcades amb una major concentració d’MPIOs presenten un augment del paràmetre associat a la complexitat cel·lular (SSC) i una disminució de la grandària (FSC) (Figura 4.2.).

L’anàlisi del percentatge d’AF-oMSCs marcades indica que l’eficiència del marcatge és superior al 65% en tots els casos (Figura 4.3.). A més, en les quatre línies d’AF-oMSCs estudiades, a major quantitat de MPIOs/AF-oMSC utilitzada durant la incubació, més elevat és el percentatge de AF-oMSCs marcades i també el valor de la intensitat de fluorescència associat. Tot i així, no existeixen diferències significatives entre les diferents condicions experimentals de marcatge a excepció dels valors obtinguts amb 25 i 500 MPIOs/AF-oMSC ($p=0,0275$).

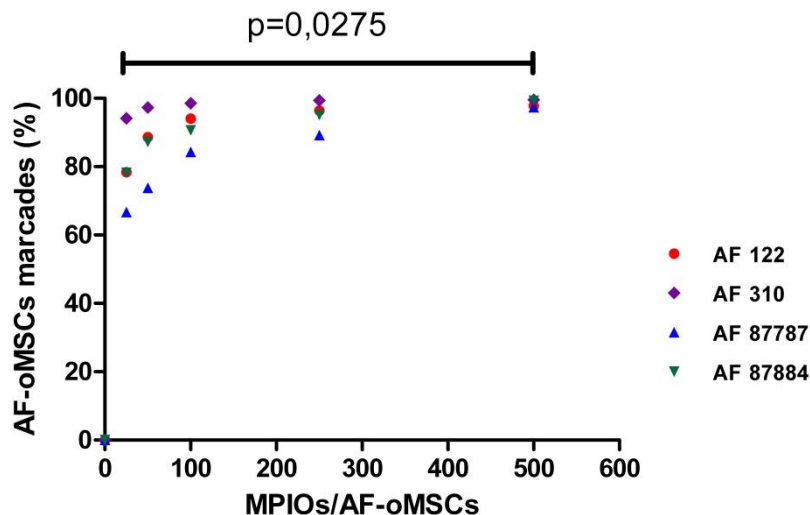


Figura 4.3. Percentatge d’AF-oMSCs marcades en funció de la concentració d’MPIOs utilitzada en quatre línies cel·lulars un cop finalitzada la incubació (temps 0 hores).

4.2.2. ESTUDI DEL PATRÓ DE CREIXEMENT DE LES AF-oMSCs MARCADES

A continuació, s'estudia si la presència intracel·lular de MPIOs modifica el patró de creixement de les AF-oMSCs. Un cop marcades, es ressemblen a baixa densitat i, després de 7 dies en cultiu es tripsinitzen i es calcula el factor d'expansió i el nombre de duplicacions assolides.

Els dos valors difereixen en funció de la línia d'AF-oMSCs. Tot i així, per a una mateixa línia d'AF-oMSCs, tant el valor del factor d'expansió (F_{exp}) com el nombre de duplicacions (N_d) després de 7 dies de cultiu són similars per les diferents quantitats de MPIOs/AF-oMSC testades i no presenten diferències significatives en comparació a les AF-oMSCs sense marcar ($p_{N_d}=0,9797$, $p_{F_{exp}}=0,9749$).

De mitjana, el factor d'expansió oscil·la entre 6.6 i 7.2 (Taula 4.1.) i el nombre de duplicacions es mou entre 3,18 i 3,58 dies⁻¹ (4.2.). Per tant, les dades obtingudes demostren que l'endocitosi de MPIOs per part de les AF-oMSCs no limita el creixement cel·lular.

Línia Cel·lular	MPIOs/AF-oMSC					
	0	25	50	100	250	500
AF 122	11,1	8,7	9,5	8,9	8,9	9,3
AF 310	3,7	4,1	4,5	5,5	5,6	3,9
AF 87787	6,9	6,6	6,8	7,5	6,5	7,5
AF 87884	6,9	7,1	7,9	6,9	6,1	6,7
Mitjana	7,1	6,6	7,2	7,2	6,8	6,8
Desviació Estàndard	3,0	1,9	2,1	1,4	1,5	2,2

Taula 4.1. Valors obtinguts del factor d'expansió de quatre línies d'AF-oMSCs marcades en funció de la concentració de MPIOs utilitzada.

Línia Cel·lular	MPIOs/AF-oMSC					
	0	25	50	100	250	500
AF 122	3,47	3,12	3,25	3,15	3,15	3,22
AF 310	3,72	4,06	4,54	5,45	5,56	3,90
AF 87787	2,78	2,71	2,77	2,91	2,71	2,90
AF 87884	2,78	2,82	2,98	2,79	2,62	2,74
Mitjana	3,19	3,18	3,38	3,58	3,51	3,19
Desviació Estàndard	0,48	0,61	0,80	1,26	1,39	0,51

Taula 4.2. Nombre de duplicacions (dies⁻¹) associat a quatre línies cel·lulars segons la concentració de MPIOs utilitzada considerant un temps de latència d'un dia.

4.2.3. ESTABILITAT DE LES MPIOs EN LES AF-oMSCs EN CULTIU

Després dels 7 dies en cultiu, es determina de nou el percentatge d’AF-oMSCs marcades i així poder valorar l’estabilitat de les nanopartícules a l’interior de les cèl·lules al llarg del temps.

De forma general, després d’aquest temps en cultiu i més de 3 duplicacions, el percentatge de cèl·lules marcades ha disminuït en totes les condicions estudiades (Figura 4.4.).

A dia 7, el percentatge d’AF-oMSCs marcades es mou entre el 31,3 i el 61,3%. De nou, les AF-oMSCs presenten un grau més elevat de marcatge quan s’ha utilitzat major concentració de MPIOs per cèl·lula ($p=0,2035$).

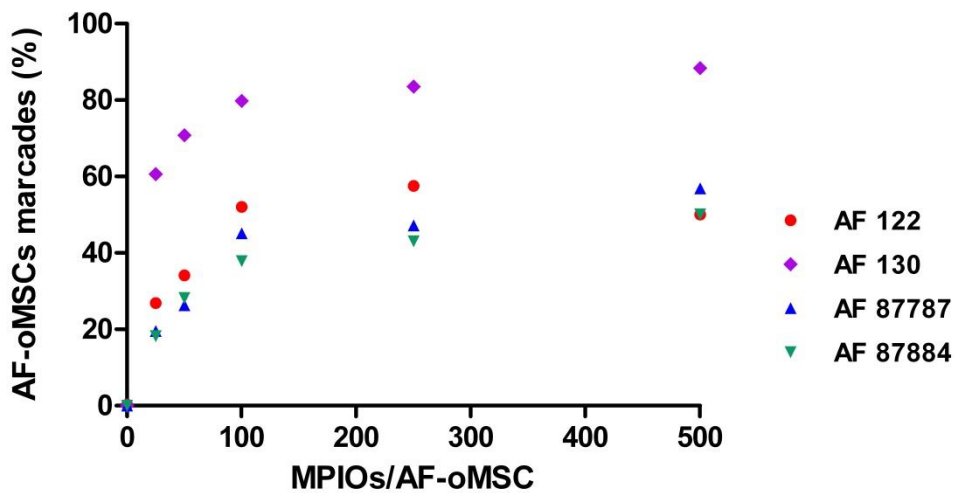


Figura 4.4. Percentatge d’AF-oMSCs marcades en funció de la concentració d’MPIOs utilitzada en quatre línies cel·lulars a temps 7 dies.

Línia Cel·lular	MPIOs/AF-oMSC				
	25	50	100	250	500
AF 122	51,5	54,5	42,0	38,9	47,8
AF 310	33,5	26,5	18,7	15,8	11,1
AF 87787	47,2	47,5	39,2	42,0	40,5
AF 87884	60,0	59,0	52,8	52,1	49,2
Mitjana	48,0	46,9	38,2	37,2	37,2
Desviació Estàndard	11,1	14,4	14,2	15,3	17,8

Taula 4.3. Reducció del percentatge d’AF-oMSCs marcades en funció de la concentració de MPIOs utilitzada després de 7 dies en cultiu en les quatre línies d’AF-oMSCs avaluades.

La reducció de la quantitat de AF-oMSCs marcades respecte al temps inicial és més pronunciada a menor quantitat de MPIOs utilitzades. En les AF-oMSCs marcades amb 25 MPIOs/ cèl·lula es redueix un 48,0% mentre que per la concentració de 500 MPIOs/ cèl·lula és només del 37,2% ($p=0,6566$).

4.2.4. ESTUDI DE SENESCÈNCIA DE LES CÈL·LULES MARCADES

Per altra banda, és interessant comprovar si es donen fenòmens de senescència cel·lular associats al marcatge amb MPIOs.

Mitjançant el test utilitzat, les cèl·lules senescentes adopten coloració blavosa. Tal com es mostra en la Figura 4.5., després de 7 dies de cultiu de les AF-oMSCs marcades, la presència de cèl·lules blaves és minoritària en totes les condicions testades. A més, el recompte de les cèl·lules positives en els pouets sembla indicar que una major concentració de MPIOs per AF-oMSCs no està relacionada amb un augment dels fenòmens de senescència (Taula 4.4).

MPIOs/AF-oMSC	0	25	50	100	250	500
AF-oMSCs positives	5	4	3	2	0	0

Taula 4.4. Recompte de AF-oMSCs 87884 P1 marcades fins a 500 MPIOs/AF-oMSC amb activitat β -galactosidasa característica de les cèl·lules senescentes.

Per tant, els resultats suggereixen que la presència de MPIOs a l'interior de les AF-oMSCs fins a 500 MPIOs/AF-oMSC no promou la senescència cel·lular.

A partir dels resultats obtinguts durant aquesta primera fase experimental, es decideix utilitzar com a concentració de marcatge d'aquí en endavant 100 MPIOs/AF-oMSC. Aquesta concentració assegura un percentatge de marcatge inicial que supera el 80%, després de 7 dies en cultiu es manté per sobre del 50% mantenint la cinètica de creixement cel·lular i sense presentar fenòmens de senescència.

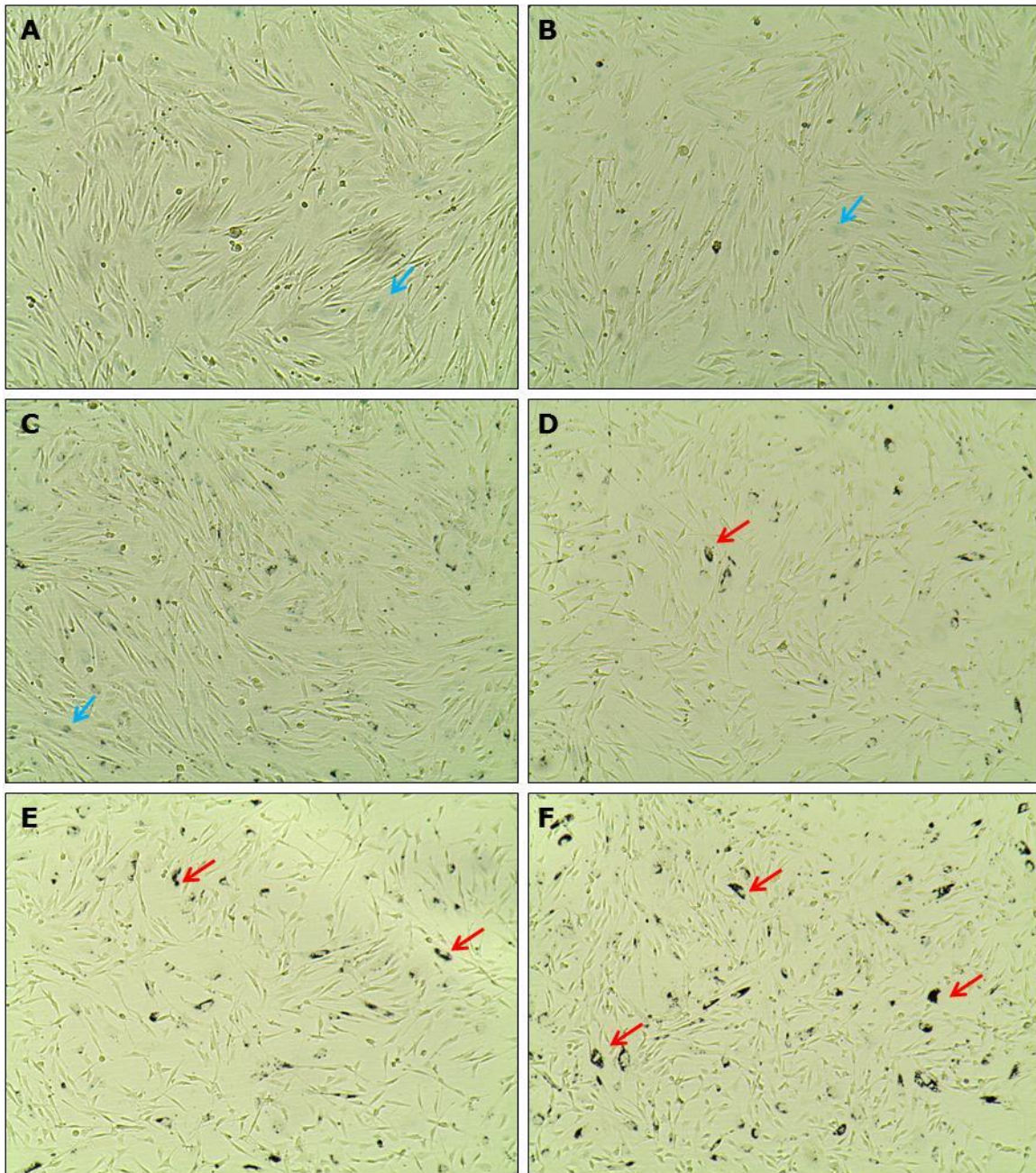


Figura 4.5. Estudi de senescència de AF-oMSCs de la línia cel·lular 87884 P1 marcades fins a 500 MPIOs/cell després de 7 dies de cultiu (4X): A) No marcades, B) 25 MPIOs/AF-oMSC, C) 50 MPIOs/ AF-oMSC, D) 100 MPIOs/ AF-oMSC, E) 250 MPIOs/ AF-oMSC i F) 500 MPIOs/ AF-oMSC. La coloració negra intracel·lular correspon a les MPIOs endocitades (fletxes vermelles) i la coloració blava a fenòmens de senescència (fletxes blaves).

4.2.5. EFECTE DE LA DENSITAT CEL·LULAR EN CULTIU EN EL MARCATGE

En experiments anteriors s'ha determinat que la proporció òptima de marcatge de les AF-oMSCs és de 100 MPIOs/cèl·lula quan es troben a una densitat de $3,0 \times 10^4$ AF-oMSCs/cm², per tal de valorar l'impacte que pot tenir una densitat de les AF-oMSCs en cultiu diferent a $3,0 \times 10^4$ cèl·lules/cm² en l'eficiència del marcatge. Per

això, es sembren AF-oMSCs a densitats creixents, d'entre $5,0 \times 10^3$ i $3,5 \times 10^4$ AF-oMSCs per cm^2 i es procedeix al marcatge a una concentració constant amb 100 MPIOs/cèl·lula ($n=3$).

En les tres línies estudiades, les dades mostren que a major densitat cel·lular, més elevat és el percentatge de AF-oMSCs marcades (Taula 4.5.). Seguint la mateixa tendència, la intensitat de fluorescència de la població positiva augmenta en les densitats cel·lulars majors.

Tot i així, per a una mateixa línia cel·lular els valors difereixen entre un 7,3 i el 18,4% i són sempre superiors al 70%. Per tant, es confirmaria que 100 MPIOs/AF-oMSC permet obtenir un nivell elevat de marcatge fins i tot, en cas que s'obtingués un nombre limitat d'AF-oMSCs al final de l'etapa d'expansió.

Densitat cel·lular (cells vives/ cm^2)	MPIOs/ AF-oMSC	Percentatge AF-oMSCs marcades (%)		
		AF 29	AF 106	AF 87787
$5,0 \times 10^3$	100	84,0	90,0	71,6
$1,0 \times 10^4$		88,9	93,5	78,1
$2,0 \times 10^4$		94,0	95,4	84,5
$3,0 \times 10^4$		97,9	96,2	87,9
$3,5 \times 10^4$		99,2	97,3	90,0

Taula 4.5. Percentatge de AF-oMSCs de la línia AF 29 P1 marcades en funció de la densitat de cel·lular.

4.2.6. DETECCIÓ DEL MARCATGE AMB MPIOs MITJANÇANT RESSONÀNCIA MAGNÈTICA

En aquest apartat es descriu la posta a punt de la detecció de les MPIOs mitjançant RMN inicialment a partir d'experiments *in vitro* i que, a posteriori, les condicions puguin ser transferides a l'anàlisi de les mostres del model animal.

4.2.6.1. Estudi de sensibilitat de la tècnica per detectar MPIOs a nivell intracel·lular

Les AF-oMSCs es marquen amb 100 MPIOs/cèl·lula just abans de la seva implantació al fetus oví durant la reparació del MMC. Pels motius exposats prèviament, es preveu que el grau de marcatge disminueixi durant el temps que les AF-oMSCs romandran en l'animal, és a dir, des de la reparació del MMC fins que la gestació arribi a terme i, en conseqüència, el senyal detectat per RMN sigui més dèbil.

En el primer experiment es valora la sensibilitat de la tècnica mitjançant solucions de AF-oMSCs marcades amb MPIOs en quantitats decreixents, concretament des de 50 a 1 MPIOs/AF-oMSC.

Tal com es descriu detalladament en l'apartat 9.9.6. de *Materials i mètodes*, es prepara un recipient amb agarosa a l'1% que conté les diferents suspensions d'AF-oMSCs marcades (phantoms) i s'adquireixen i analitzen.

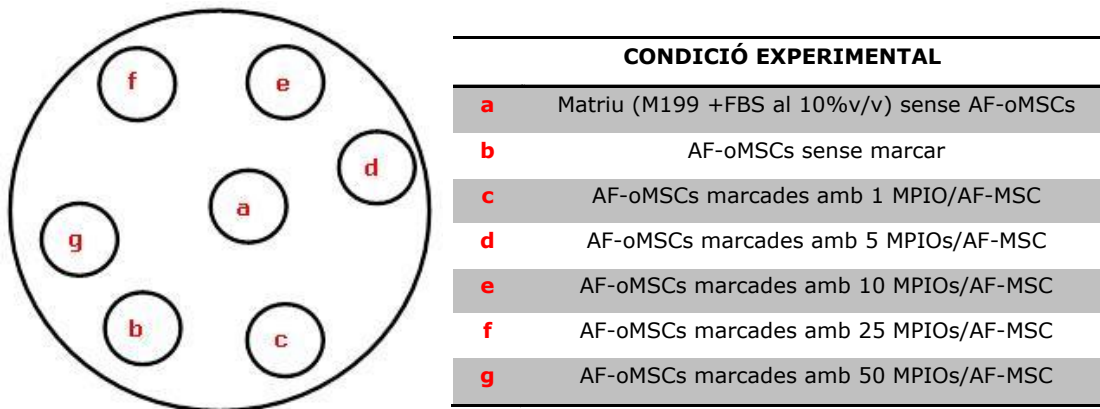


Figura 4.6. Representació gràfica de la vista superior del recipient que conté les diferents suspensions d'AF-oMSCs marcades (Phantoms) i les condicions experimentats associades.

De les quatre adquisicions (T2W, T2*W, TE=12ms i T2map), la imatge que ofereix millor contrast amb una bona resolució espacial, i per tant, una major visualització de les AF-oMSCs marcades és la imatge ponderada en T2* (T2*W) on s'arriben a observar les AF-oMSCs com a punts negres més definits (Figura 4.7.).

A partir de la imatge T2*W, s'analitza la intensitat corresponent a cada condició experimental i es detecta que existeix una correlació entre la pèrdua de senyal i la concentració de marcatge des de 50 fins a 1 MPIOs/AF-oMSC (r Pearson= -0,9234). Tot i així, el valor d'intensitat obtingut per la solució marcada amb 1 MPIO/AF-oMSC està a mig camí entre el valor corresponent a la solució sense marcar i la pròpia matriu on es troben resuspeses les cèl·lules (Taula 4.6).

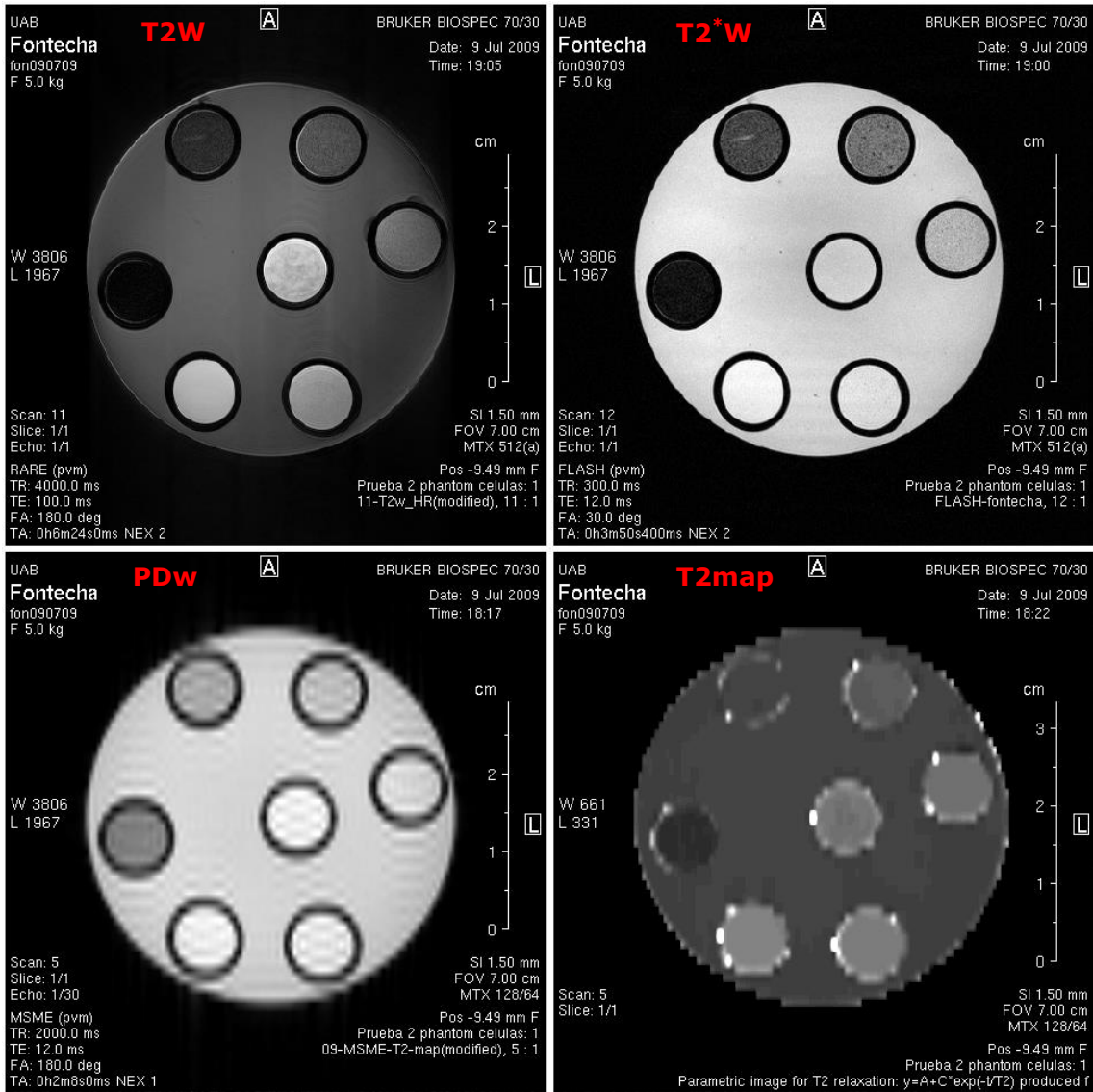


Figura 4.7. Imatges resultants de l’anàlisi dels phantoms corresponents a la matrius, AF-oMSCs sense marcar i AF-oMSCs marcades fins a 50 MPIOs/AF-oMSC.

	CONDICIÓ EXPERIMENTAL	INTENSITAT
a	Matriu (M199 +FBS al 10%v/v) sense AF-oMSCs	397,0±10,7
b	AF-oMSCs sense marcar	471,0±12,3
c	AF-oMSCs marcades amb 1 MPIO/AF-MSC	433,0±15,0
d	AF-oMSCs marcades amb 5 MPIOs/AF-MSC	351,0±21,0
e	AF-oMSCs marcades amb 10 MPIOs/AF-MSC	223,0±28,8
f	AF-oMSCs marcades amb 25 MPIOs/AF-MSC	150,0±29,3
g	AF-oMSCs marcades amb 50 MPIOs/AF-MSC	44,5±15,1

Taula 4.6. Valors d’intensitat associats a cada condició experimental testada: matrius, AF-oMSCs sense marcar i AF-oMSCs marcades fins a 50 MPIOs/AF-oMSC.

En conseqüència, d'aquest primer estudi se'n deriven dos experiments complementaris. Primerament, ens interessa veure si modificant les condicions d'adquisició de la mostra som capaços de detectar les cèl·lules marcades amb 1 MPIO/AF-oMSC.

Efectivament, tal com es mostra en la següent figura, utilitzant una sonda més potent, augmentant la resolució de la imatge, un temps d'acumulació experimental més llarg (2h 20 segons) i un gruix de secció de 0.5 mm som capaços de detectar les AF-oMSCs i fins i tot, de forma individual (punts negres).

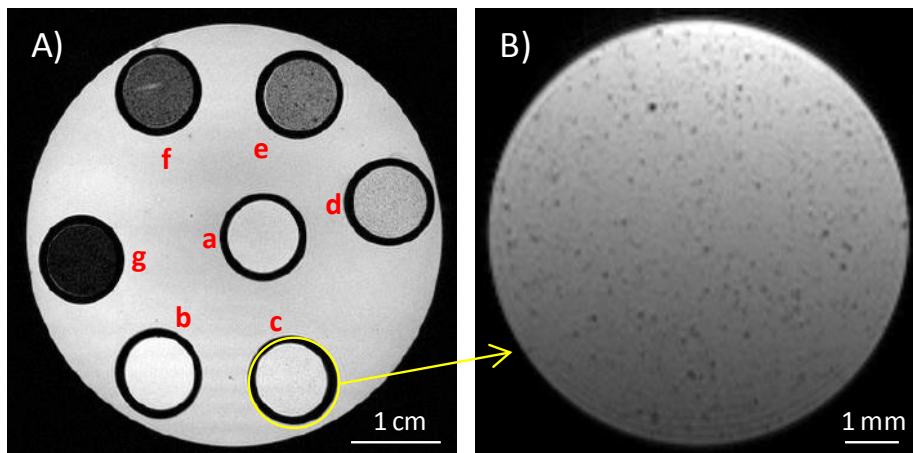


Figura 4.8. A) Phantoms que contenen AF-oMSCs marcades a diferents concentracions: a) Medi basal; b) AF-oMSCs sense marcar; c-g) AF-oMSCs marcades a 1, 5, 10, 25, i 50 MPIOs/AF-oMSC, respectivament. B) Imatge de RMN d'alta resolució del phantom amb cèl·lules marcades a 1 MPIO/AF-oMSC.

En segon lloc, s'estudia la sensibilitat de la tècnica al diluir les AF-oMSCs marcades amb 5 MPIOs/AF-oMSC en diferents proporcions (0, 1, 10, 25, 50, 75 i 100%) amb cèl·lules sense marcar. Aquesta vegada també s'ha pogut detectar de forma favorable la presència de les AF-oMSCs marcades en la preparació (imatge no mostrada).

Per tant, sembla evident que la tècnica permet la detecció de AF-oMSCs marcades amb quantitats molt reduïdes de MPIOs.

4.2.6.2. Detecció de les cèl·lules marcades en la zona reparada del MMC

Amb aquest estudi es pretén avaluar, primerament, si és possible identificar les estructures adjacents al MMC quan es fixa una vèrtebra en gel d'agarosa i s'analitza per RMN. I en segon lloc, confirmar que es pot detectar la pèrdua de senyal associada a la presència de AF-oMSCs marcades en la zona del MMC.

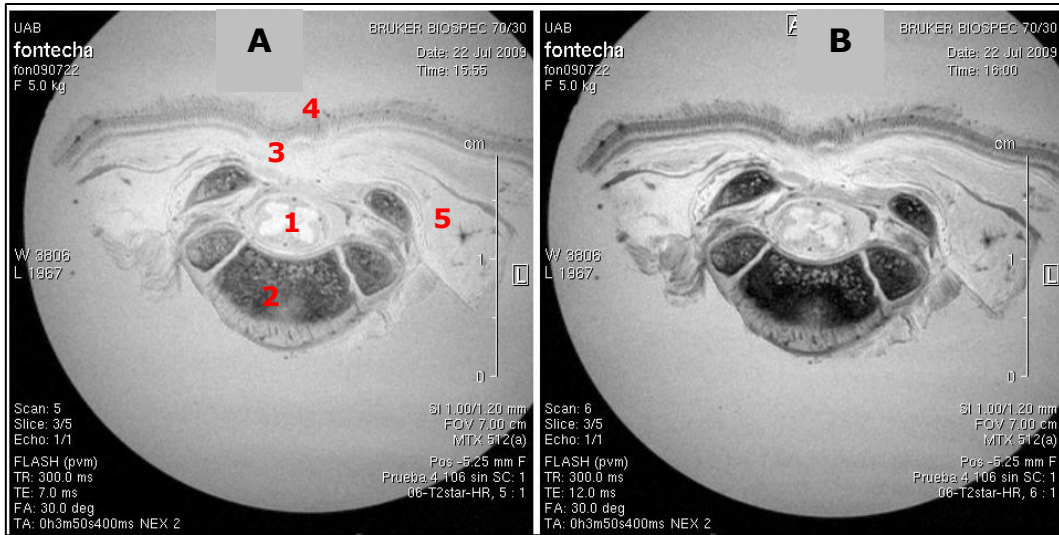


Figura 4.9. Tall transversal d'una vèrtebra de l'ovella 106 amb inducció quirúrgica de MMC A) Temps d'eco (TE)=7ms, B) TE=12 ms): 1) Medul·la espinal, 2) Cos vertebral, 3) Zona del MMC, 4) Pell, 5) Múscul.

Així doncs, primerament es prepara dins un gel d'agarosa una vèrtebra corresponent a un cas MMC reparat sense utilitzar AF-oMSCs marcades. A partir de la imatge en T2*W s'observa el teixit ossi corresponent al cos vertebral i la part lateral de l'arc vertebral més fosc (regió hipotensa), a la part més central la medul·la espinal de color gris i blanca; al lateral el teixit muscular i a l'extrem superior la recoberta de pell amb pèl. A més, es pot distingir clarament la manca de la part posterior de l'arc vertebral, característic del MMC.

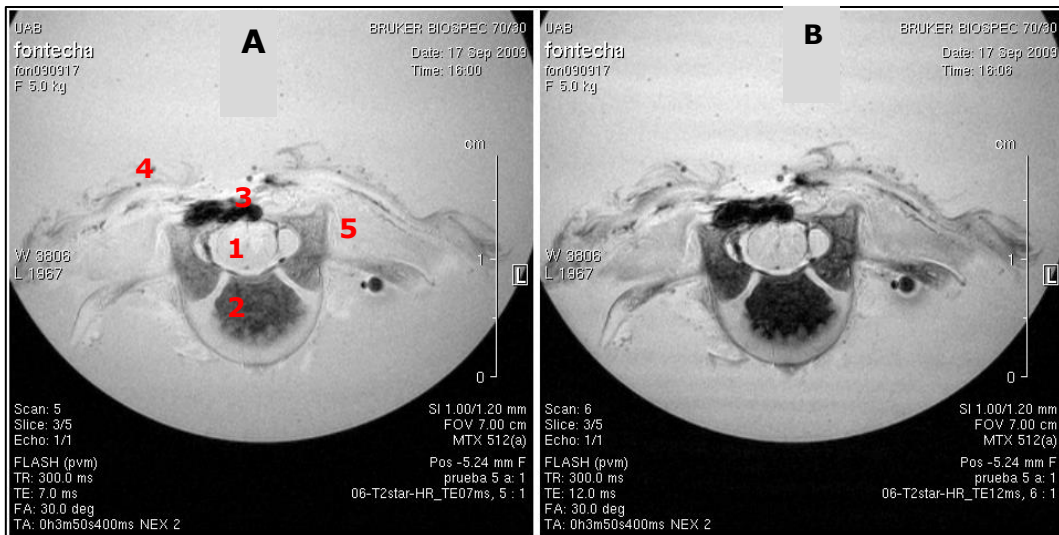


Figura 4.10. Tall transversal d'una vèrtebra de l'ovella 106 amb inducció quirúrgica de MMC a la que se li ha injectat *ex vivo* AF-oMSCs marcades (A) TE = 7 ms, B) TE=12 ms): 1) Medul·la espinal, 2) Cos vertebral, 3) Zona del MMC, 4) Pell, 5) Múscul.

A continuació, es recupera la vèrtebra, s'injecta una solució de AF-oMSCs marcades de forma localitzada a la zona del MMC i es prepara de nou el gel d'agarosa. Tal com es pot observar en la següent figura, s'identifica una pèrdua de senyal clara de color negre en la zona de reparació associada a la presència d'AF-oMSCs marcades amb MPIOs.

4.3. DISCUSSIÓ DE RESULTATS I CONCLUSIONS

En aquest capítol, s'ha posat a punt amb èxit el protocol de marcatge, i posterior quantificació mitjançant citometria de flux, de les AF-oMSCs utilitzant MPIOs conjugades amb el marcador fluorescent Dragon Green.

Incubant les MPIOs durant 20-24h, s'ha definit com a concentració òptima de marcatge 100 MPIOs/AF-oMSC, ja que s'obté una eficiència de marcatge superior al 80%, mantenint una elevada viabilitat cel·lular, sense modificar el seu patró de creixement ni l'aparició de fenòmens de senescència cel·lular. El marcatge amb una quantitat de MPIOs que no sigui tòxica és essencial per tal d'evitar alteracions en la viabilitat cel·lular i el potencial migratori o regenerador de les MSCs (124).

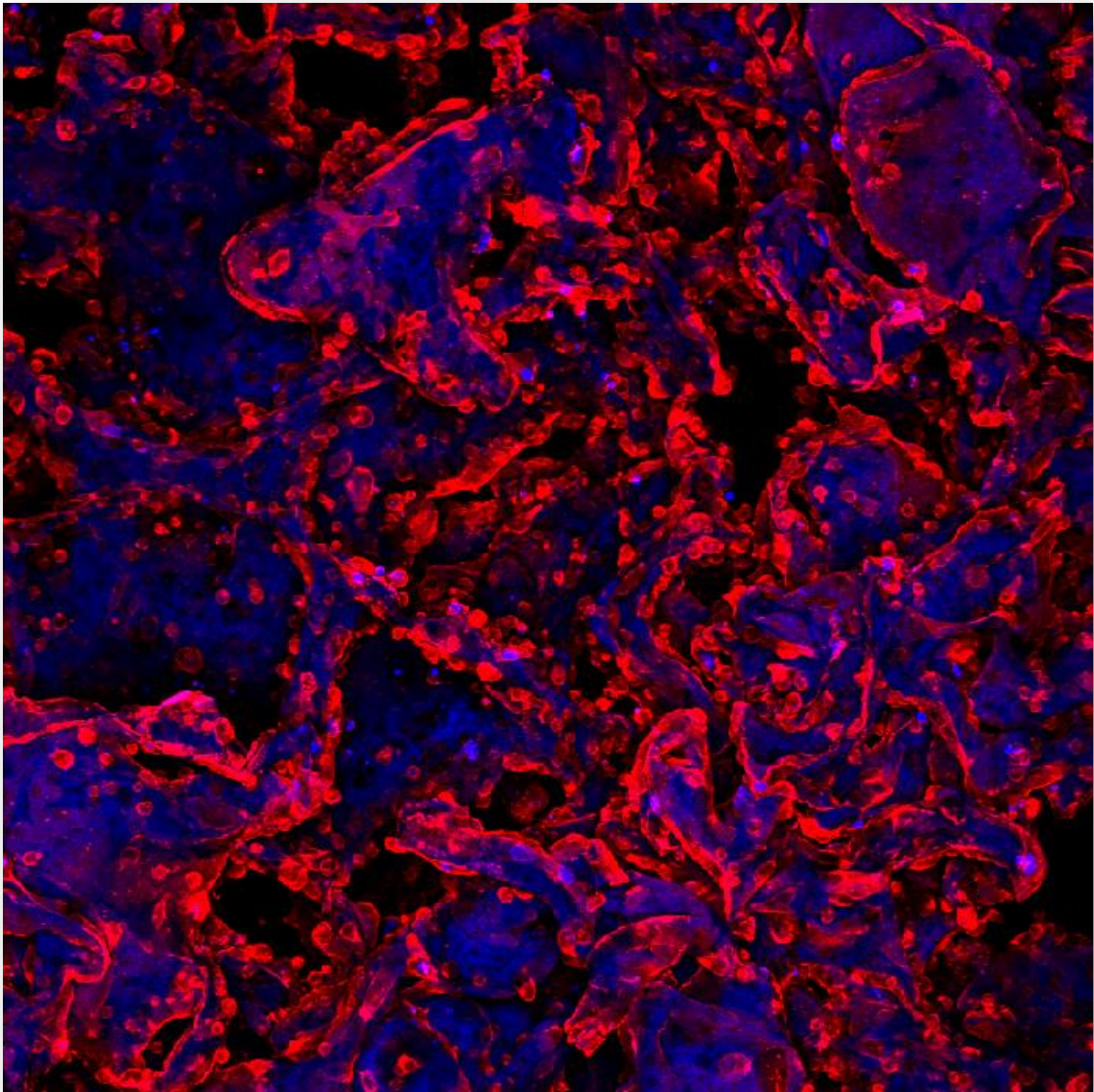
Mantenint les AF-oMSC marcades en cultiu, i després d'aproximadament 3 divisions, es detecta una disminució de la intensitat de fluorescència de AF-oMSCs marcades que reflecteix la distribució de les MPIOs a les AF-oMSCs filles. Resultats similars s'han obtingut en altres treballs en què s'han utilitzat les MPIOs del mateix proveïdor per marcar MSCs de l'espècie humana (117) i porcina (125).

Per altra banda, s'ha estudiat la detecció de les AF-oMSCs marcades amb MPIOs mitjançant RMN. Hem demostrat que som capaços d'identificar-les a concentracions molt reduïdes, essent 1 MPIO/AF-oMSC la mínima quantitat detectable. El fet que la mida de les MPIOs sigui superior a altres partícules superparamagnètiques d'òxid de ferro àmpliament utilitzades com els ferrumòxids, permet un millor contrast en les imatges de RMN i que al seu torn, fa disminuir el llindar de detecció fins a detectar les cèl·lules de forma individual (125, 126). En aquest sentit, les MPIOs que s'han testat en el present capítol, s'han avaluat com a marcador de llarga durada en estudis en models animals de diferents patologies (117, 125, 127) i s'han obtingut resultats favorables.

Finalment, s'ha confirmat que es poden identificar clarament per RMN les AF-oMSCs marcades i administrades de forma localitzada *in vitro* en vèrtebres fetals ovines.

En la literatura, hi ha molta informació reportada sobre el marcatge de MSCs de moll os amb MPIOs. En canvi, per MSCs procedents d'AF és limitada (127). El present treball confirma la possibilitat de fer seguiment d'aquest tipus cel·lular en models experimentals.

Amb tot, aquests resultats suggereixen que l'aplicació del protocol de marcatge establert farà possible el seguiment de les AF-oMSCs al final de la gestació de les ovelles, aproximadament 6 setmanes després de la reparació del MMC.



CAPÍTOL 5:
REPARACIÓ PRENATAL DEL MMC UTILITZANT
BIOMATRIUS D'ÀCID POLILÀCTIC-CO-GLICÒLIC
COLONITZADES AMB AF- α MSCs

5.1. INTRODUCCIÓ

Un cop desenvolupat el protocol estandarditzat per a l'aïllament i expansió d'AF-oMSCs fins a dosi clínica, així com per al seguiment de les cèl·lules en el teixit reparat, l'objectiu es centra en buscar un vehicle adequat per administrar les AF-oMSCs.

Alhora d'escollir un suport cel·lular per a un producte d'enginyeria tissular, cal tenir en compte que el biomaterial presenti certes característiques ideals com són (128):

- Estructura tridimensional (3D)
- Estructura altament porosa que permeti l'adhesió i proliferació cel·lular així com la producció de matriu extracel·lular.
- Una xarxa porosa permeable i interconnectada que permeti l'intercanvi de nutrients i productes de rebuig.
- Un substrat biocompatible i biodegradable amb taxes de degradació controlades.
- Superfície químicament adequada per l'adhesió, proliferació i diferenciació cel·lular.
- Propietats mecàniques que permetin el suport o unió als teixits de la zona d'implantació de la biomatriu.
- Una arquitectura que promogui la formació d'estructura tissular anisotròpica nativa.
- Una arquitectura reproduïble i amb una mida i forma clínicament apropiada.

Entre els diferents tipus de suports cel·lulars disponibles, els polímers sintètics compostos per materials orgànics biocompatibles són una alternativa interessant. Concretament, l'àcid polilàctic (PLA), l'àcid poliglicòlic (PGA) o els copolímers dels anteriors (polilàctic-co-glicòlic, PLGA) en forma de microesferes, fibres o esponges són els més utilitzats per a diverses aplicacions biomèdiques.

Les biomatrius de PLGA serveixen com a vehicle per a l'administració de fàrmacs (per exemple: vacunes, antibiòtics, antiinflamatoris, etc.) (129). També s'han avaluat en àrees del camp de l'enginyeria tissular tan diverses com són la regeneració del cartílag articular (130, 131), la formació de teixit ossi en defectes mandibulars (132) o com a guies dels conductes nerviosos en lesions medul·lars (133). El seu ús en humans està aprovat per la *Food and Drug Administration* (FDA; Estats units) com a sutures degradables en determinats tipus d'intervencions quirúrgiques (134).

El PLGA pot fabricar-se en motlles tridimensionals per obtenir la forma i mida adequada a la lesió que es vol tractar. La seva estructura porosa permet la penetració de fluids al seu interior i, per tant, la migració i distribució homogènia de les cèl·lules dins els constructes.

Diversos paràmetres com la proporció de PLA:PGA que el componen, el pes molecular, la grandària i forma de les biomatrius determinen la seva taxa de degradació. El seu ajust és imprescindible perquè sigui compatible amb el temps que requereixen les cèl·lules per sintetitzar matriu extracel·lular *in vivo*, i posteriorment es doni vascularització i generació de nou teixit.

En aquest sentit, estudis previs duts a terme pel nostre grup amb biomatrius de PLGA fabricades amb proporcions 50 (PLA): 50 (PLGA) i amb una grandària de porus de 300-500 μm han demostrat la preservació de la seva integritat *in vitro* durant 5 setmanes (135). Aquest temps coincidiria amb l'inici de la mineralització per part de les MSCs, que segons el treball publicat per Barry et al. (136) es donaria entre els 9 i 20 dies de la seva administració. A partir de les 5 setmanes, la biomatriu de PLGA començaria el procés de degradació i conclouria aproximadament a les 8 setmanes.

També hem demostrat la seguretat de la utilització d'aquestes biomatrius colonitzades amb MSCs de moll d'os, en un model oví per a la regeneració de defectes osteocondrals locals obtenint, a més, resultats d'eficàcia prometedors (135).

Així doncs, en aquest capítol es pretén desenvolupar un producte d'enginyeria tissular a partir de biomatrius de PLGA i AF-oMSCs i, posteriorment, aplicar-lo en el model experimental de MMC per avaluar el possible efecte regenerador de teixits com l'os o el cartílag.

5.2. RESULTATS

5.2.1. FABRICACIÓ DE LES BIOMATRIUS DE PLGA

Per dur a terme aquesta part experimental, s'ha treballat en tot moment amb matrius biocompatibles d'acid polilàctic-glicòlic (PLGA) preparades al Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, tal com es descriu en l'apartat de material i mètodes 9.11.1. *Manufactura de les Biomatrius de PLGA*. Es caracteritzen per ser hidrofòbiques, tenir una mida de 1.5 x 2 x 0.2 cm (llarg x ample x alçada) i una grandària de porus d'entre 300 i 500 µm.

5.2.2. COLONITZACIÓ DE LES BIOMATRIUS DE PLGA AMB AF-oMSCs *IN VITRO*

Primerament, es fa una prova de concepte assajant tres metodologies de colonització: A) Colonització en sistema no agitat, B) Colonització en sistema agitat mitjançant centrifugació i C) Colonització en sistema agitat fent ús de l'equip MACSMix de Miltenyi.

Tenint en compte que la dosi cel·lular màxima que es pretén utilitzar en la reparació del MMC és de 4×10^6 AF-oMSCs vives, s'utilitza aquesta quantitat de cèl·lules per experimentar amb les biomatrius de PLGA. Les AF-oMSCs, prèviament a l'inici de la colonització, s'han marcat amb nanopartícules a una relació de 100 MPIOs per AF-oMSC tal com s'ha descrit en l'anterior capítol.

5.2.2.1. Colonització de les biomatrius de PLGA en sistema no agitat

El primer experiment consisteix en posar en contacte la solució cel·lular amb la biomatriu prèviament hidratada, i incubar en sistema no agitat a 37°C durant 2h. Un cop finalitzat aquest temps, es visualitza la biomatriu de PLGA mitjançant microscòpia confocal.

S'observa que l'estructura porosa de la matriu es conserva i que part de les cèl·lules no s'han adherit a la biomatriu, sinó que es troben suspeses en el medi líquid circumdant (Figura 5.1.).

A continuació, es procedeix al rentat i condicionat final de la matriu i es recompten les cèl·lules no adherides a la matriu, que corresponen al 61,5%. Per tant, el percentatge de colonització obtingut és només del 38,5%.

Aquest resultat suggereix que per augmentar la taxa d'adherència cal un temps més llarg de contacte entre les cèl·lules i la biomatriu abans de fer l'acondicionat final de la biomatriu.

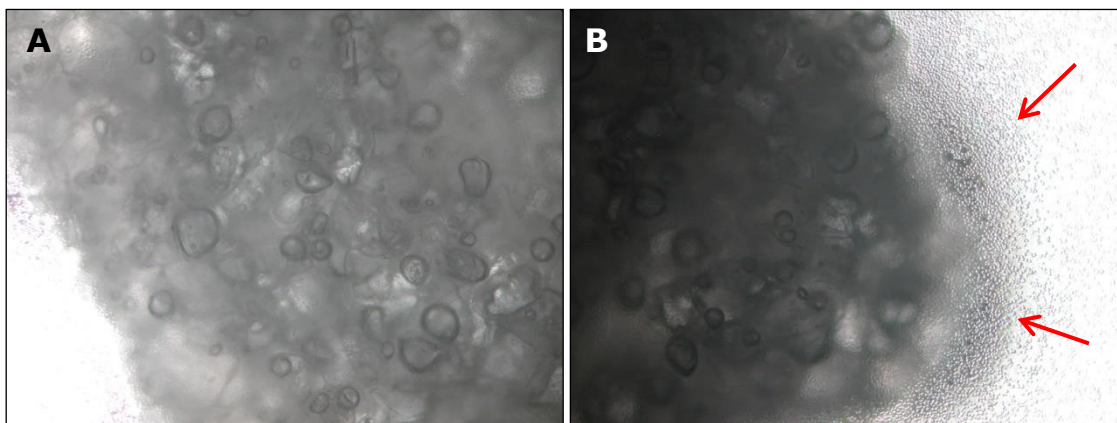


Figura 5.1. Aspecte de la biomatriu de PLGA colonitzada en sistema no agitat amb AF-oMSCs F122P P1 mitjançant microscòpia òptica (4X). En la imatge de l'esquerra (A) s'observa l'elevada porositat de la biomatriu de PLGA i, en la de la dreta (B), les fletxes vermelles indiquen les AF-oMSCs al sobrenedant i que per tant, no s'han adherit a la biomatriu.

5.2.2.2. Colonització en sistema agitat mitjançant centrifugació

Aquest protocol afavoreix l'entrada de les AF-oMSCs a través dels porus de la matriu per aplicació en primer lloc de dos cicles curts de centrifugació, seguit d'incubació en sistema no agitat per aconseguir l'adherència de les cèl·lules a la superfície de la matriu. Finalment, la matriu es condiciona i es recuperen les cèl·lules no adherides.

En aquest cas, el percentatge de colonització que s'assoleix és del 80.0%, el que significa una millora destacable respecte el protocol anterior.

5.2.2.3. Colonització en sistema agitat utilitzant l'equip MACSMIX

La colonització de la matriu de PLGA amb AF-oMSCs en sistema agitat fent ús de l'equip MacsMix (Miltenyi Biotech) es fa a 37°C. El programa escollit combina cicles curts en repòs per afavorir l'adherència cel·lular a la biomatriu, seguit d'un temps més llarg en moviment i rotació per resuspendre les cèl·lules que hagin sedimentat i permetre de nou el contacte de les cèl·lules amb la matriu.

La biomatriu de PLGA s'introdueix en 15 mL de suspensió cel·lular a una concentració de $2,4 \times 10^5$ AF-oMSCs/mL, i es fa la colonització durant 21 hores a 37°C. Passat aquest temps, la concentració cel·lular de la suspensió ha disminuït fins el $6,5 \times 10^4$ AF-oMSCs/mL que correspon a un percentatge de colonització del 73,4%.



Figura 5.2. Colonització de la biomatriu de PLGA amb AF-oMSCs F122P P4.

Dels tres protocols estudiats, el segon protocol ofereix el major percentatge de colonització. Tot i així, requereix 6 hores consecutives per dur a terme el protocol complet fins a deixar la biomatriu en solució de condicionament apunt per la reparació del MMC en el model oví. En el nostre cas, tenim una limitació horària important i utilitzar el tercer protocol ens permet fer-la durant la nit. A més, el percentatge de colonització obtingut és prou elevada. És per aquest motiu que es decideix escollir la colonització en sistema agitat utilitzant l’equip MACSMix com a metodologia de treball.

5.2.3. OPTIMITZACIÓ DE LA COLONITZACIÓ EN SISTEMA AGITAT UTILITZANT L’EQUIP MACSMIX

Els següents experiments tenen com a objectiu optimitzar el protocol de colonització en sistema agitat utilitzant l’equip MACSMix.

5.2.3.1. Efecte de la concentració cel·lular en la colonització

Per estudiar la influència de la concentració cel·lular en la cinètica de colonització de les biomatrius, es testen tres concentracions cel·lulars: $1,0 \times 10^5$, $2,5 \times 10^5$ i $5,0 \times 10^5$ AF-oMSCs/mL.

		AF-oMSCs totals		
		3,75 x10 ⁶		
Solució cel·lular inicial	Volum (mL)	37,5	15,0	7,5
	Concentració cel·lular (AF-oMSCs/mL)	1,0 x10 ⁵	2,5 x10 ⁵	5,0 x10 ⁵

Taula 5.1. Concentració cel·lular i volum de les suspensions cel·lulars F122P P1 que s'utilitzen per a la colonització en sistema agitat.

Es fa la colonització partint del mateix número total de cèl·lules totals que es resuspen en diferents volums per obtenir les tres concentracions cel·lulars desitjades.

Després de 17 hores de colonització, l'aspecte macroscòpic és equivalent per a les 3 biomatrius (Figura 5.3.). La hidratació de la matriu li confereix certa flexibilitat tot mantenint la seva consistència.

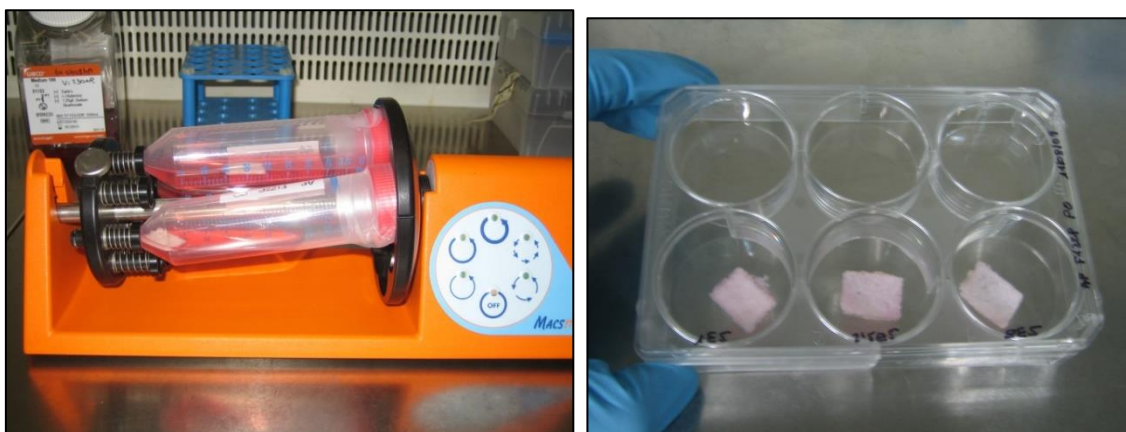


Figura 5.3. Aspecte macroscòpic de les biomatrius un cop finalitzat el procés de colonització.

Es recupera el medi sobrenedant de la colonització i es recompten les cèl·lules presents, d'aquesta manera es pot calcular la quantitat d'AF-oMSCs adherides a la matriu. Els percentatges de colonització obtinguts varien del 75,6 al 83,4%.

Concentració cel·lular inicial (AF-oMSCs/mL)	1,0 x10⁵	2,5 x10⁵	5,0 x10⁵
AF-oMSCs al medi sobrenedant	9,2 x10 ⁵	7,7 x10 ⁵	6,2 x10 ⁵
Percentatge de colonització (%)	75,6	79,5	83,4

Taula 5.2. Percentatge de colonització utilitzant cèl·lules de la línia AF-oMSCs F122P P1 a diferents concentracions.

Tot i així, els valors suggereixen que a major concentració cel·lular utilitzada, s'obté major percentatge de colonització (r Pearson= 0,9897).

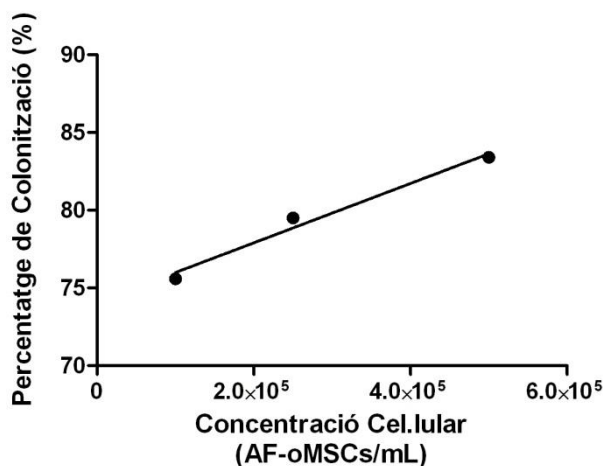


Figura 5.4. Representació gràfica del percentatge de colonització obtingut utilitzant solucions cel·lulars a diferent concentració.

Tal com s'ha esmentat al capítol 3, la quantitat de AF-oMSCs obtinguda després de les etapes d'aïllament i l'expansió varia en funció de la línia cel·lular. En aquells casos en què la recuperació de cèl·lules és limitada, partir en la colonització d'una concentració de $5,0 \times 10^5$ AF-oMSCs/mL es traduiria en treballar amb un volum de líquid molt petit i que no asseguraria tenir la matriu submergida en tot moment, i per tant, es podria induir la mort cel·lular.

5.2.3.2. Homogeneïtat de les AF-oMSCs adherides a la biomatriu mitjançant microscopia confocal

Un cop finalitzada la colonització de les biomatrius de PLGA es fa la tinció de les AF-oMSCs adherides i es visualitzen per microscòpia confocal.

En primer lloc, comentar que la biomatriu presenta autofluorescència en els tres canals (verd, blau i vermell). Gràcies a aquest fet, es constata l'estructura porosa de la matriu (Figura 5.5.).

Una vegada s'aplica un major augment i, gràcies a la utilització de colorants específics pel nucli, s'observen les AF-oMSCs adherides a la matriu tant en la superfície externa com en l'interior de la biomatriu (Figura 5.6.).

De totes maneres, cal destacar que quan la colonització en sistema agitat s'ha fet a partir de la suspensió cel·lular a $5,0 \times 10^5$ AF-oMSCs/mL, la homogeneïtat de la densitat de les cèl·lules en la matriu és menor. S'observen més agregats cel·lulars a

les zones perifèriques de la matriu i menor presència de cèl·lules a l'interior (imatge no mostrada).

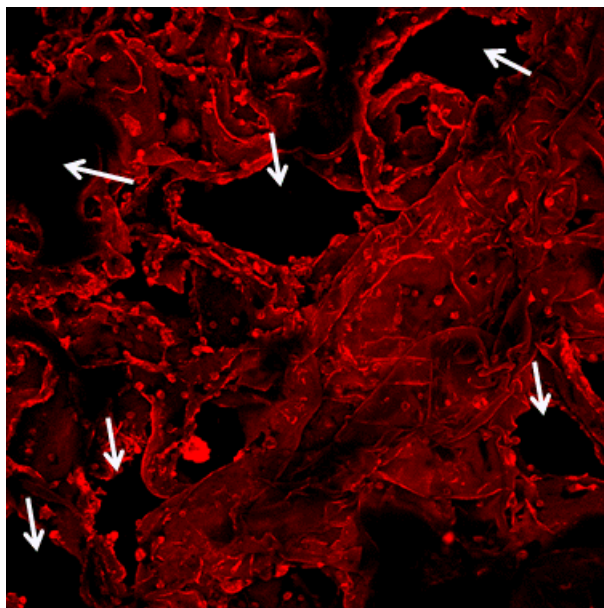


Figura 5.5. Biomatriu de PLGA colonitzada amb AF-OMSCs de línia cel·lular 4761 (10X). La biomatriu presenta autofluorescència en canal vermell. Les fletxes blanques mostren la posició dels porus en la matriu.

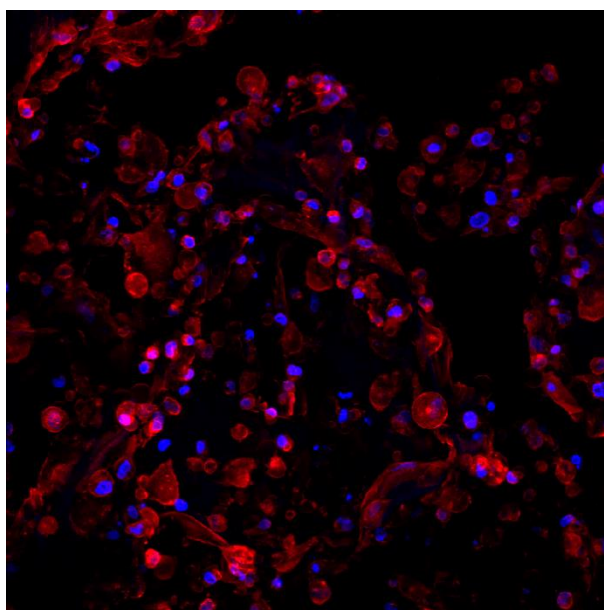


Figura 5.6. AF-OMSCs de la línia cel·lular 7799 adherides a la biomatriu de PLGA (20X). En vermell (PKH26) es mostra el citoplasma i en blau (DAPI) el nucli cel·lular.

Per tant, els resultats indiquen que la concentració de $2,5 \times 10^5$ AF-OMSCs/mL és la concentració més adequada per fer les colonitzacions en sistema agitat, ja que ofereix un percentatge de colonització elevat al mateix temps que les cèl·lules es distribueixen de forma homogènia per tota la superfície de la biomatriu.

A continuació, s'estudia el temps òptim de colonització per assegurar la màxima quantitat de cèl·lules adherides a la biomatriu.

5.2.3.3. Cinètica de colonització de les biomatrius de PLGA

Es fa la colonització de biomatrius de PLGA utilitzant suspensions cel·lulars a concentració 2.5×10^5 AF-oMSCs/mL de tres línies cel·lulars (AF-oMSCs 104, 106 i 107).

En els tres casos, la presència de cèl·lules en suspensió disminueix al llarg del temps de forma gradual fins a un temps màxim d'entre 14 i 16 hores, moment a partir del qual s'estabilitza.

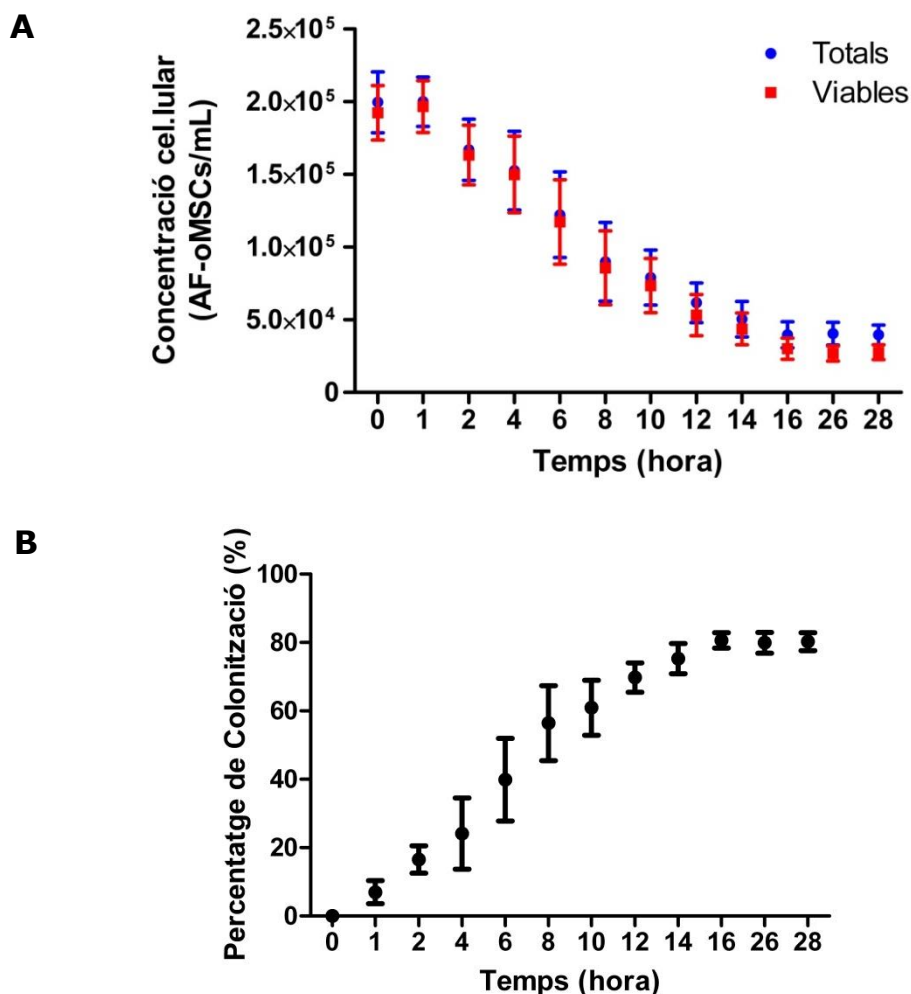


Figura 5.7. Cinètica de colonització de la biomatriu de PLGA amb AF-oMSCs (n=3): A) Concentració cel·lular al medi sobrenedant al llarg del temps, B) Percentatge de colonització associat al llarg del temps.

En cap dels tres experiments, s'observen agregats cel·lulars al medi sobrenedant durant la colonització. El percentatge de colonització assolit a les 16 hores es mostra en la següent taula:

Línia Cel·lular	Percentatge de Colonització (%)
AF-oMSCs 104 P3	76,2
AF-oMSCs 106 P3	83,1
AF-oMSCs 107 P3	82,6
Mitjana	80,6
Desviació Estàndard	3,8

Taula 5.3. Percentatge de colonització de les biomatrius de PLGA utilitzant diferents línies cel·lulars.

A partir d'aquests resultats es conclou que la durada òptima del procés per tal de maximitzar la colonització de la biomatriu de PLGA és de 16 hores.

5.2.3.4. Estabilitat de les biomatrius de PLGA colonitzades amb AF-oMSCs *in vitro*

Un cop colonitzada la biomatriu i, fins al moment de la seva implantació en l'animal, poden passar fins a 24 hores. Per tant, és important comprovar que la viabilitat de les AF-oMSCs no es veu compromesa durant aquest temps.

S'estudia l'estabilitat del producte en presència de medi complet a 37°C, 5% CO₂ i 95% HR fins als 5 dies després de la colonització.

Durant aquest temps, l'aspecte i consistència de la matriu es veu modificada. La biomatriu colonitzada canvia la seva forma de plana a corba i s'endureix dràsticament (Figura 5.8.).

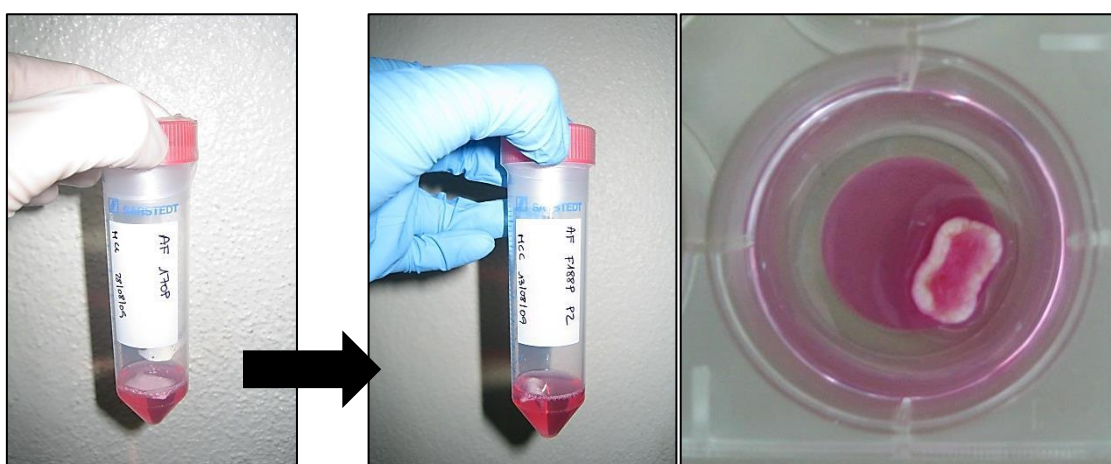


Figura 5.8. Aspecte de la biomatriu 5 dies postcolonització i incubació a 37°C en medi complet.

Adicionalment es fan dos estudis mitjançant microscòpia:

A) Estabilitat de les AF-oMSCs en les biomatrius de PLGA mitjançant Microscòpia confocal de Fluorescència:

A les 24 hores de la colonització, les AF-oMSCs mantingudes en medi de cultiu suplementat i a 37°C continuen adherides a la biomatriu. La forma de les AF-oMSCs és generalment arrodonida i amb petites prolongacions citoplasmàtiques.

Després de 5 dies en cultiu, les MSCs han adoptat la seva forma fibroblàstica característica. A més, s'observa el contacte entre cèl·lules i també doblets de cèl·lules, possiblement resultat de la divisió cel·lular (Figura 5.9.).

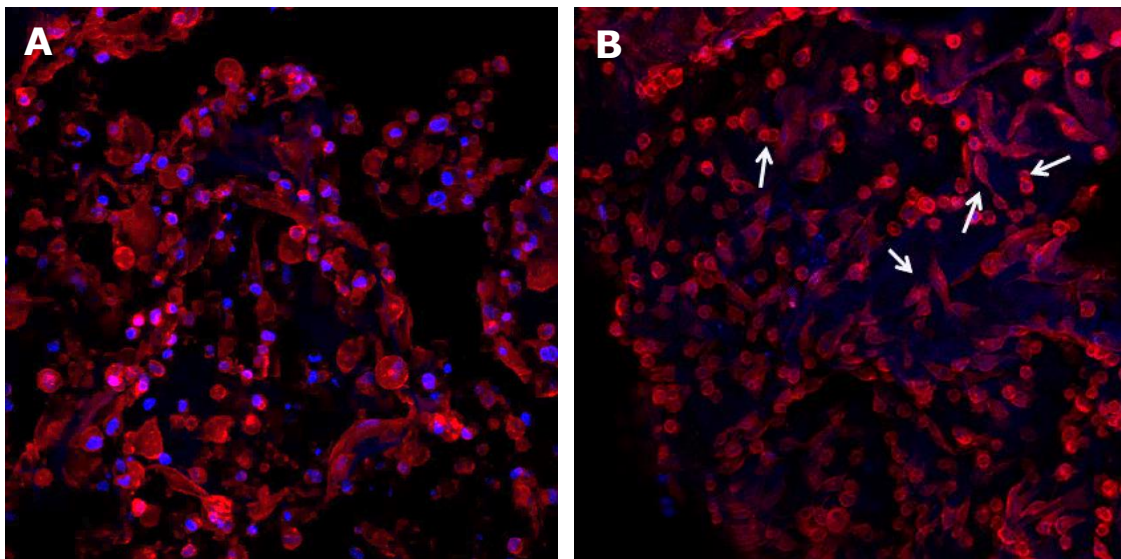


Figura 5.9. Biomatriu de PLGA colonitzada amb AF-oMSCs 7799 i mantinguda durant (A) 3 dies i (B) 5 en cultiu; 20X. En vermell es mostra el citoplasma i en blau el nucli cel·lular. Les fletxes mostren doblets d'AF-oMSCs indicatiu de la divisió cel·lular.

B) Estabilitat de les AF-oMSCs en les biomatrius de PLGA mitjançant Microscòpia Electrònica:

L'observació de les biomatrius colonitzades per microscòpia electrònica ens permet veure la distribució i morfologia de les cèl·lules fins i tot més clarament que utilitzant la microscòpia confocal. De nou, les cèl·lules adherides a la biomatriu al finalitzar la colonització (n=3) presenten tant forma arrodonida com morfologia més fibroblàstica. A més, s'observen interaccions entre les cèl·lules a través de les prolongacions citoplasmàtiques (Figura 5.10.).

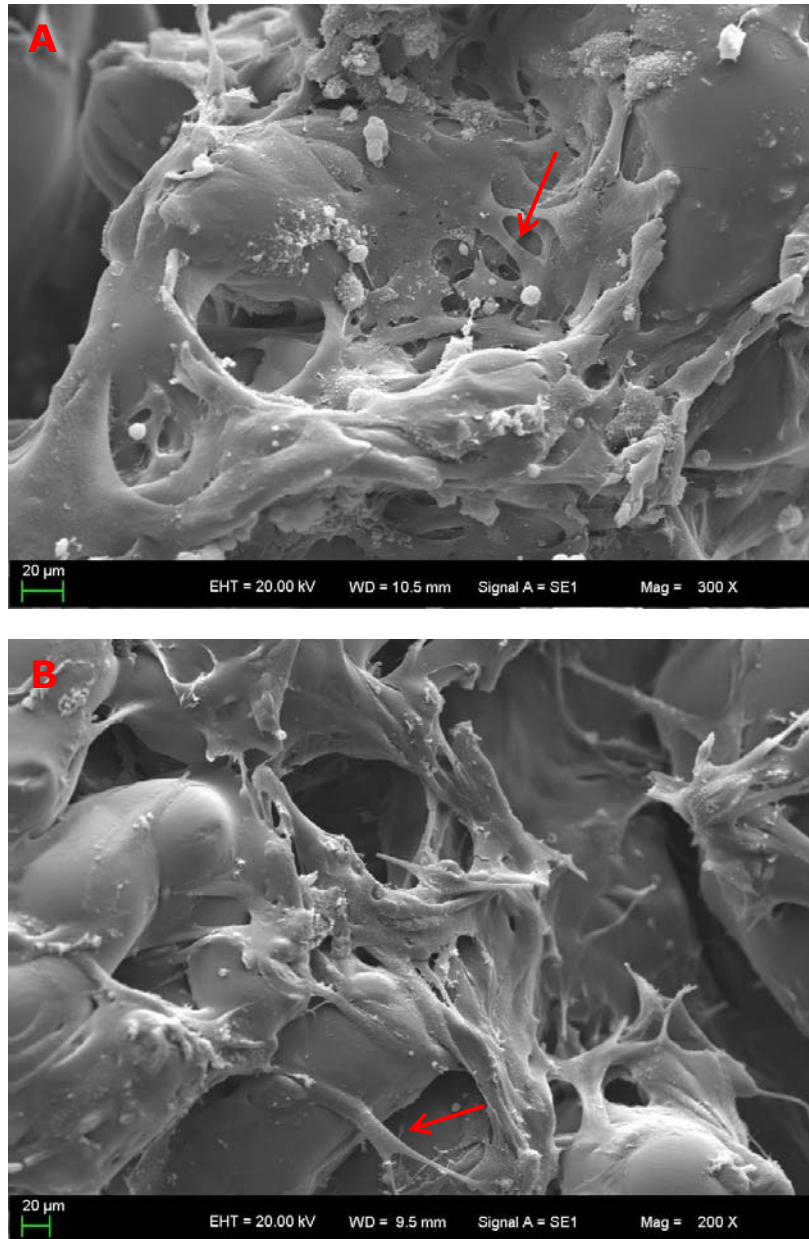


Figura 5.10. Observació per Microscòpia Electrònica de la biomatriu de PLGA colonitzada amb: A) AF-oMSCs 106 (300X) i B) AF-oMSCs 107 (200X). Les fletxes vermelles indiquen les AF-oMSCs sobre la matriu.

A les 24h de la colonització, s'observa la creació d'una xarxa tridimensional de cèl·lules sobre l'estructura de la biomatriu (imatges no mostrades). Després de 5 dies en cultiu, la densitat cel·lular sobre la matriu ha augmentat de forma considerable. Les cèl·lules s'han duplicat tant en la superfície com en les zones poroses de la matriu, de tal manera que no es pot distingir la superfície original de la biomatriu (Figura 5.11.).

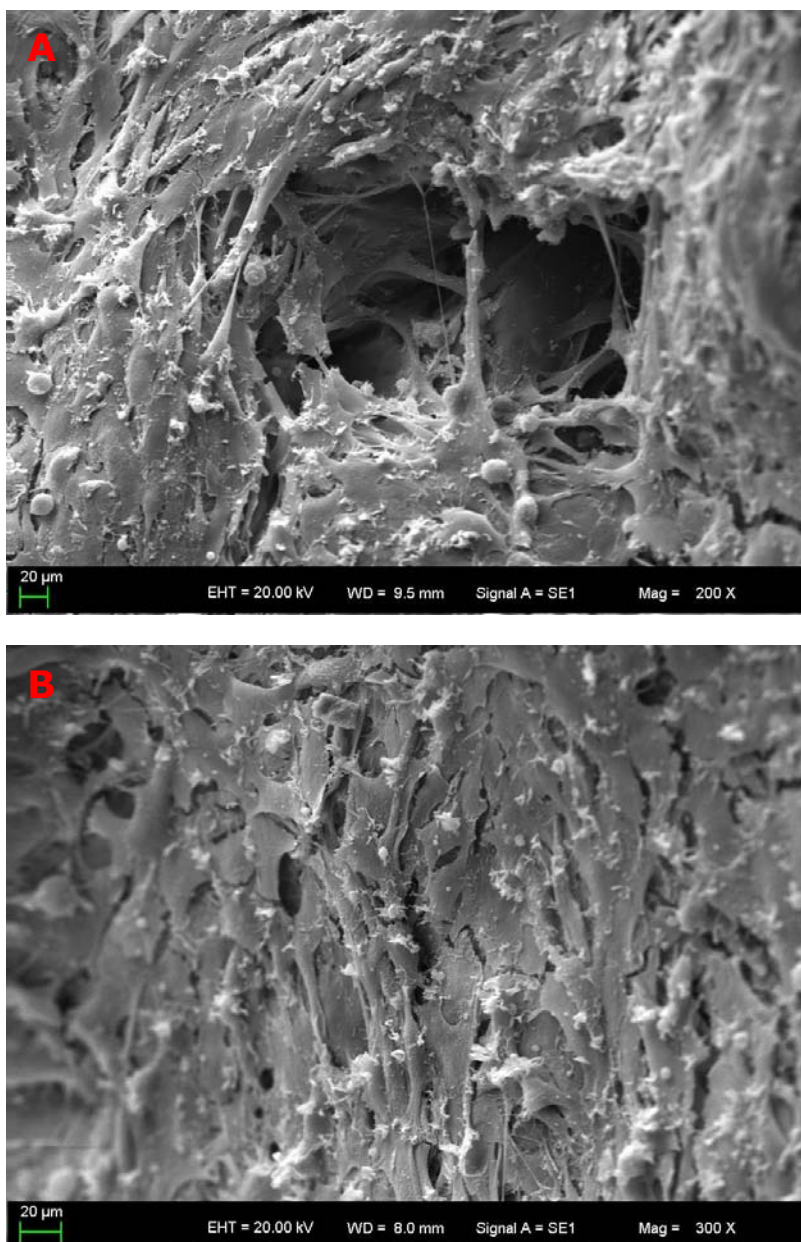


Figura 5.11. Biomatrius de PLGA colonitzada amb AF-oMSCs 107 i conservada en medi complet a 37°C durant 5 dies per Microscòpia Electrònica: A) Visió interna (200X) i B) Visió perifèrica (300X).

Per tant, a partir d'una suspensió cel·lular a $2,5 \times 10^5$ AF-oMSCs/mL i portant a terme la colonització de les biomatrius de PLGA en sistema agitat utilitzant l'equip MACSMix durant unes 16 hores, s'aconsegueix un elevat percentatge de colonització que es considera suficient per a l'objectiu d'aquest estudi. Les cèl·lules, a més, es mantenen vives a la matriu si es conserven en medi complet i a 37°C durant les hores posteriors a la colonització, moment en el que són aplicades en el model animal.

5.2.4. REPARACIÓ DEL MMC AMB BIOMATRIUS DE PLGA COLONITZADES AMB AF-oMSCs

L'estudi s'inicia amb 12 ovelles gestants que es divideixen en tres grups experimentals:

- Grup 1: PLGA (control); 4 animals
- Grup 2: PLGA+AF-oMSCs; 4 animals
- Grup 3: PLGA+ AF-oMSCs marcades amb MPIOs; 4 animals

El procediment consisteix primerament en la inducció quirúrgica del defecte en el fetus oví al voltant del dia 75 de gestació, etapa en la qual també es recull l'AF. Entre la cirurgia fetal de producció i la de reparació del MMC, es deixa un període de tres setmanes per tal que la lesió s'estableixi i s'assembli més a un defecte natural i no a una ferida aguda. Durant aquestes tres setmanes, es cultiven i multipliquen les AF-oMSCs, i es marquen amb MPIOs si s'escau. Després d'aquest temps es colonitzen les biomatrius de PLGA amb les cèl·lules que, finalment, s'implanten en l'animal afectat durant la cirurgia de reparació del MMC.

5.2.4.1. Inducció quirúrgica del MMC

La cirurgia per la creació del defecte es fa en ovelles gestants que es troben a 75 dies (68-82) de gestació.

Totes les cirurgies s'han fet seguint la metodologia descrita en l'apartat de materials i mètodes 9.1. *Cirurgia d'inducció del Mielomeningocele*. Breument, un cop l'ovella gestant està anestesiada, s'obra la paret abdominal i la paret de l'úter per tal que el fetus oví pugui ser exposat a l'exterior per la part lumbar. A continuació, es resectiona l'arc vertebral posterior de les tres últimes vèrtebres de la zona lumbar (Figura 5.12.). Finalment, s'obre la duramàter per permetre la sortida del líquid cefaloraquídi cap a l'exterior.

Un cop finalitzada la creació del MMC, s'introdueix el fetus a l'interior de l'úter i es sutura l'úter i la paret abdominal perquè la lesió evolucioni.

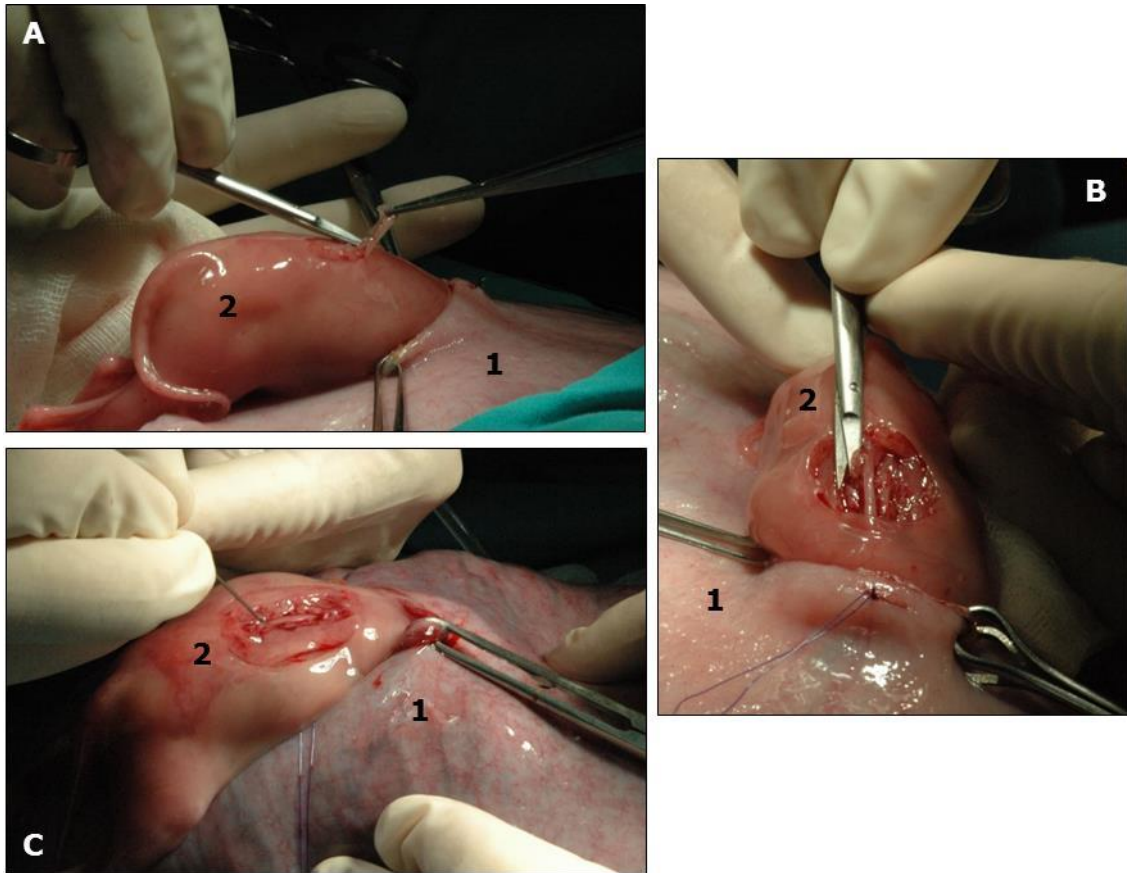


Figura 5.12. Inducció quirúrgica del Mielomeningocele de l'ovella 306: 1) Paret uterina, 2) Part posterior del fetus oví. A) Resecció de pell i musculatura, B) Resecció dels arcs vertebrals, C) Obertura de la duramàter amb una agulla fina.

Es fan totes les cirurgies d'inducció sense complicacions ni desviacions destacables a excepció de l'ovella 4641. En aquest animal, la cirurgia es retarda dos dies respecte el programat per assegurar una mida adequada del fetus en el moment de la manipulació.

5.2.4.2. Aïllament, expansió i marcatge de AF-oMSCs

Durant la inducció quirúrgica del MMC, es recullen 81 mL (73-96) d'AF de les ovelles que es repararan amb presència de cèl·lules. En tots els casos les mostres d'AF s'han emmagatzemat a temperatura ambient fins al seu processament entre 2,0 i 4,5 hores després de l'obtenció.

L'aspecte dels líquids amniòtics és el característic amb coloració grogosa, amb presència de cèl·lules epitelials i sense contaminació eritrocitària.

Es fa la sembra directa de 76 (50-80) mL d'AF en Medi M199 complet per a l'aïllament i expansió de AF-oMSCs. Després de 18 (17-20) dies s'obtenen $2,30 \times 10^6$ ($1,04 - 3,83 \times 10^6$) AF-oMSCs amb una viabilitat cel·lular superior al 95%. En alguns

casos, es completa l'expansió cel·lular amb una passi adicional per tal d'ajustar el cultiu a la data de la cirurgia de la reparació, obtenint una quantitat de cèl·lules superior.

Seguidament, es duu a terme el marcatge de les cèl·lules destinades al grup experimental (3) a una concentració de 100 MPIOs/cèl·lula (n=4). Després de 20-22 hores d'incubació a 37°C, el percentatge de cèl·lules amb presència de MPIOs a l'interior determinat per citometria de flux, varia del 89,4 al 95,0%.

LÍNIA CEL·LULAR	188	1818	4671	016
Dosi AF-oMSCs	3,83 x10 ⁶	1,86 x10 ⁶	2,16 x10 ⁶	2,85 x10 ⁶
AF-oMSCs marcades (%)	95,0	89,4	93,8	94,6
Dosi AF-oMSCs marcades	3,64 x10 ⁶	1,66 x10 ⁶	2,03 x10 ⁶	2,70 x10 ⁶

Taula 5.4. Dades relatives al marcatge de les AF-oMSCs amb MPIOs: dosi cel·lular inicial, eficiència del marcatge i dosi de AF-oMSCs final.

5.2.4.3. Colonització de biomatrius de PLGA per a implantació *in vivo*

En primer lloc, cal remarcar que es porta a terme un número menor de colonitzacions de l'inicialment previst a causa de l'avortament de part dels animals entre la cirurgia de creació del defecte i la reparació del MMC. A conseqüència, els animals destinats a cada grup experimental es veuen modificats. Concretament, es colonitzen un total de 6 biomatrius de PLGA amb AF-oMSCs expandides i portades a concentració de 2,5x10⁵ AF-oMSCs vives/mL en medi basal.

La durada del procés utilitzant l'equip MACSMix varia entre 14 i 17 hores. Les cèl·lules en el medi de colonització en aquest temps disminueixen en concentració fins a 5,13x10⁴ (2,00x10⁴ - 1,05x10⁵) AF-oMSCs/mL i presenten una viabilitat final del 86,5 (68,9-91,7)%.

Aquest valors es tradueixen en un percentatge de colonització del 78.5 (58.7-92.3)%. En el medi de colonització no s'observen agregats cel·lulars amb MPIOs, a excepció de les AF-oMSCs de la línia 1818 que coincideix amb la línia cel·lular amb menor percentatge de viabilitat.

5.2.4.4. Implantació de les biomatrius colonitzades en fetus ovins amb MMC induït quirúrgicament a meitat de gestació

Tal com s'ha comentat anteriorment, la taxa d'avortament en aquest model experimental és molt elevada. En el moment de la reparació es disposa únicament

de 7 ovelles gestants, que es distribueixen en els tres grups experimentals de la següent manera:

- Grup 1: PLGA (control); 3 animals
- Grup 2: PLGA + AF-oMSCs; 2 animals
- Grup 3: PLGA+ AF-oMSCs marcades amb MPIOs; 2 animals

En el moment de la reparació, tres animals presenten sinèquia uterina (ovella 101, 106 i 109). La lesió creada aproximadament tres setmanes abans mostra un aspecte semblant al d'un MMC natural, amb exposició de la medul·la espinal i pèrdua de líquid cefaloraquídi. En tres fetus ovins (ovella 101, 109 i O16) però, s'observa el tancament espontani d'una part del defecte (Figura 5.13. A).

A continuació es procedeix a la reparació del MMC, en primer lloc dipositant la biomatrius de PLGA sobre el defecte, es recobreix amb un substitut de pell Matriderm® i finalment es fixa amb adhesiu biològic COSEAL® (Figura 5.13.)

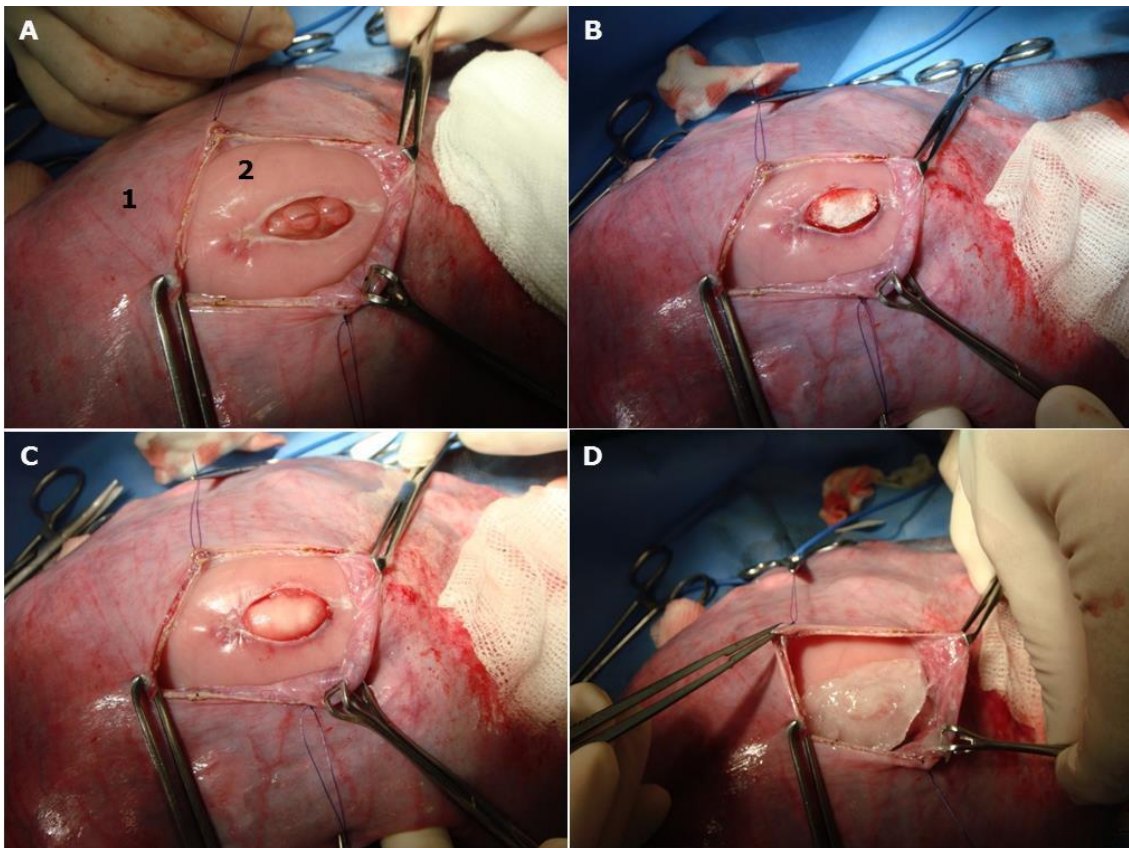


Figura 5.13. Reparació del MMC de l'ovella 101: A) Exposició del MMC, B) Disposició de la biomatriu de PLGA sobre el defecte i C) Cobertura amb el substitut de pell Matriderm® que queda enterrat perifèricament per la pell; D) Segellat amb COSEAL® . 1) Paret uterina i 2) Part posterior del fetus oví.

És important esmentar, que es produeix el trencament d'una de les biomatrius de PLGA durant la seva manipulació (ovella 170) i en la reparació del MMC de l'ovella O16 no es fa el segellat amb COSEAL®.

Després de la reparació, es produeix la pèrdua per avortament de 2 fetus ovins de cadascun dels grups experimentals, cosa que significa que únicament arriba una ovella gestant a terme.

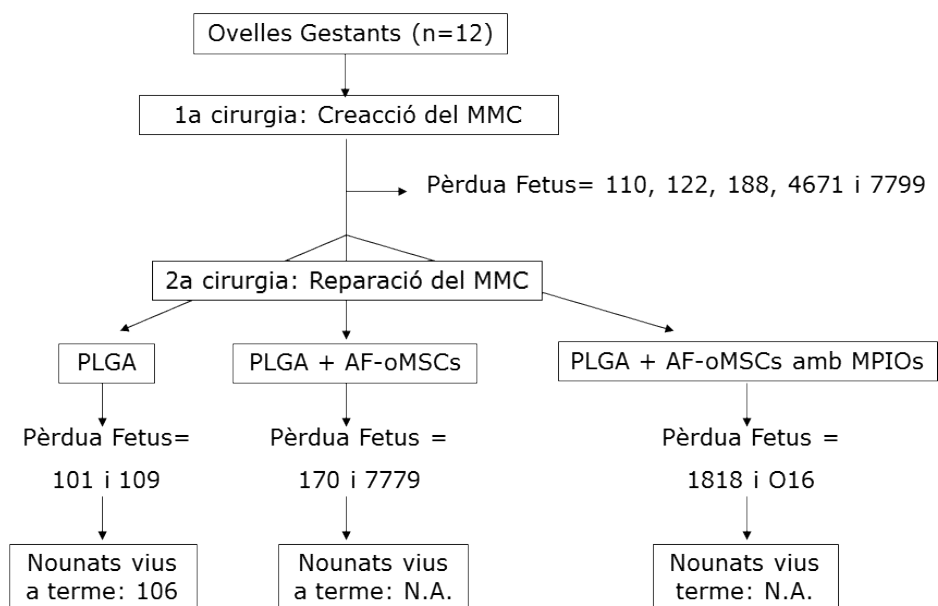


Figura 5.14. Evolució dels grups experimentals corresponents a la reparació amb biomatrius de PLGA al llarg del temps.

Concretament, dels tres animals del grup control, el primer és avortat, el segon es recupera mort al fer la cesària i el tercer neix viu a terme.

OVELLA	CONSTRUCTE	Dosi cel·lular (AF-oMSCS vives)	Temps evolució (dies)
101	PLGA		48
106	PLGA	N.A.	56
109	PLGA		42
170	PLGA+AF-oMSCs	2,08x10 ⁶	15
7779	PLGA+ AF-oMSCs	1,79x10 ⁶	25
1818	PLGA+ AF-oMSCs amb MPIOs	1,23x10 ⁶	21
O16	PLGA+ AF-oMSCs amb MPIOs	2,90x10 ⁶	7

Taula 5.5. Resum dels animals reparats amb biomatrius de PLGA (i AF-oMSCs, si escau), la dosi d'AF-oMSCs administrada i el temps d'evolució dels animals.

Dels 4 animals reparats amb biomatrius colonitzades, un es recupera mort al final de la gestació durant la cesària i els altres tres van ser avortats entre 7-21 dies després de la reparació. Per tant, la supervivència dels animals reparats amb PLGA és inferior al 10%.

Finalment destacar que els animals del grup control han evolucionat durant un temps major a la resta, concretament entre 42 i 56 dies.

5.2.5. AVALUACIÓ DEL FETUS OVINS TRACTATS

En els casos que és possible, es recuperen els fetus morts derivats de fenòmens d'avortament (n=6) per fer una avaluació macroscòpica del defecte, així com histològica de la medulla espinal i dels teixits adjacents (Figura 5.15.). En el cas de l'animal que neix a terme viu mitjançant cesària del grup control, addicionalment s'explora clínicament pel que fa a l'estat motor i neurològic.

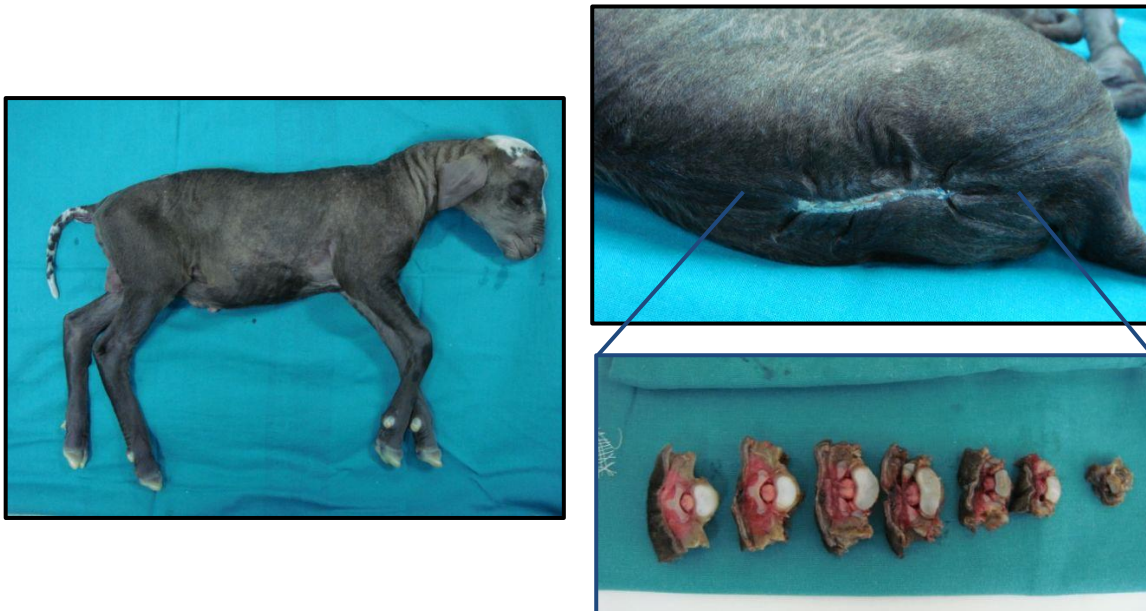


Figura 5.15. Recuperació del fetus oví 7799 per avaluació macroscòpica del defecte i preparació de les vèrtebres reparades per a la seva avaluació.

Pel que fa a l'únic nounat oví arribat a terme viu (106), no mostra evidència de trastorns en la deglució i l'esfínter anal sembla preservar la funció. Però en canvi, sí que presenta dificultat de moviment (paraparèsia) en les extremitats posteriors i té incontinència urinària.

Els estudis histològics de la zona reparada mostren que l'evolució dels animals ha sigut molt dispar (Taula 5.6.).

Ovella	Grup experimental	Evolució (dies)	Medul·la espinal	Presència de cartílag	Presència d'os	Presència de múscul	Presència de teixit fibrós	Presència de pell	Material estrany (COSEAL®)	Hemorràgia	Congestió	Detecció de AF-oMSCs marcadés
101	PLGA (control)	48	No conservada	NO	NO	NO	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ (Teixit fibrós i COSEAL®)	SÍ (Teixit fibrós)	SÍ (Zona hemorràgica)
106	PLGA (control)	56	No conservada	NO	NO	NO	SÍ	SÍ	SÍ	NO	SÍ (Teixit fibrós)	NO
109	PLGA (control)	42	No conservada	NO	NO	NO	SÍ	SÍ (Hiperqueratòsica)	SÍ	SÍ (Pell i sota la medul·la)	NO	SÍ (Zona hemorràgica)
170	PLGA + AF-oMSCs	15	No conservada	NO	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO
7779	PLGA + AF-oMSCs	25	Conservada	NO	NO	NO	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ (Medul·la i subcutània)	NO	SÍ (Zona hemorràgica)
1818	Fibrina + AF-oMSCs marcadés	21	Herniada i adherida al PLGA	NO	NO	NO	SÍ	SÍ (Ulcerada)	SÍ	SÍ (Subepidèrmica)	NO	SÍ
016	Fibrina + AF-oMSCs marcadés	7	Conservada	NO	NO	NO	SÍ	NO	SÍ	NO	NO	SÍ

Taula 5.6. Avaluació histològica de la zona del MMC reparada amb biomatrius de PLGA i AF-oMSCs (si aplica). Per a cadascuna de les ovelles, s'identifica el grup experimental al que pertanyen, els dies des de la reparació fins a l'obtenció del nounat oví i s'avalua l'estat de la medul·la espinal, la presència de pell, múscul, cartílag, os, teixit fibrós, hemorràgia, congestió i la detecció de cèl·lules marcadés.

En cap dels tres animals control (101, 106 i 109) no s'observen restes de la biomatriu de PLGA. En els animals que han evolucionat durant menys temps des de la reparació, s'observa la presència de restes de la biomatriu en la zona del MMC i la seva ubicació correspon a la de l'arc vertebral posterior (Figura 5.16).

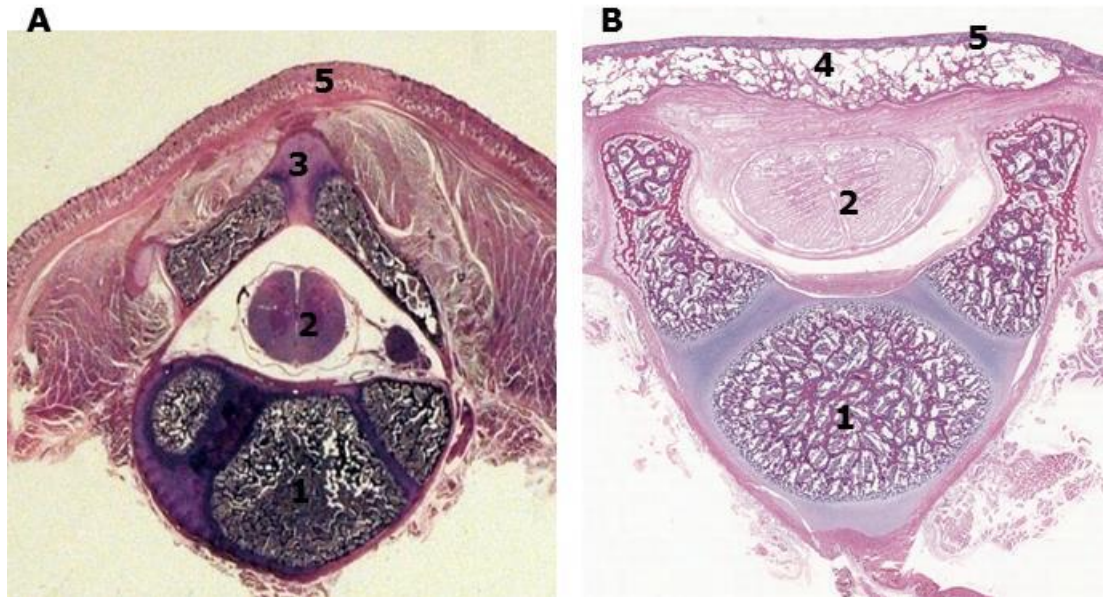


Figura 5.16. Preparació histològica de les vèrtebres ovines amb Tinció Hematoxilina -Eosina (HE; 1X). A) Vèrtebra sana; B) Vèrtebra de l'ovella O16 reparada amb biomatriu de PLGA i AF-oMSCs marcades amb MPIOs i després de 7 dies d'evolució. 1) Cos vertebral, 2) Medul·la espinal, 3) Arc vertebral posterior, 4) Biomatriu PLGA, 5) Pell.



Figura 5.17. Tinció HE d'una vèrtebra 101 reparada amb PLGA sense AF-oMSCs després de 48 dies d'evolució en què s'observa que la medul·la està aixafada (1X).

El defecte es troba correctament tancat en quatre animals, tres dels quals són del grup control (101, 106 i 109) i un del grup de PLGA + AF-oMSCs (7779). D'altra banda, la conservació de l'estructura de la medul·la s'ha mantingut en només dos dels set casos estudiats (7779 i O16) (Figura 5.17).

S'estudia el tipus de teixit neofomat en la zona corresponent a l'arc vertebral posterior, entre la medul·la i la pell. Primerament, cal comentar que de forma general la cel·lularitat de la zona és més elevada si la reparació s'ha fet amb AF-oMSCs en comparació amb el grup control.

En cap dels animals avaluats s'observa presència de teixit muscular ni tampoc osteo-cartilaginós (objectiu del tractament experimental). El teixit format en la zona de reparació presenta un patró organitzat. Mitjançant tincions immunohistoquímiques, es determina que correspon a teixit connectiu ja que presenta expressió positiva per Col·lagen III (marcador de la cicatrització) i, en canvi, és negatiu per la Desmina (proteïna característica del múscul) (Figura 5.18.).

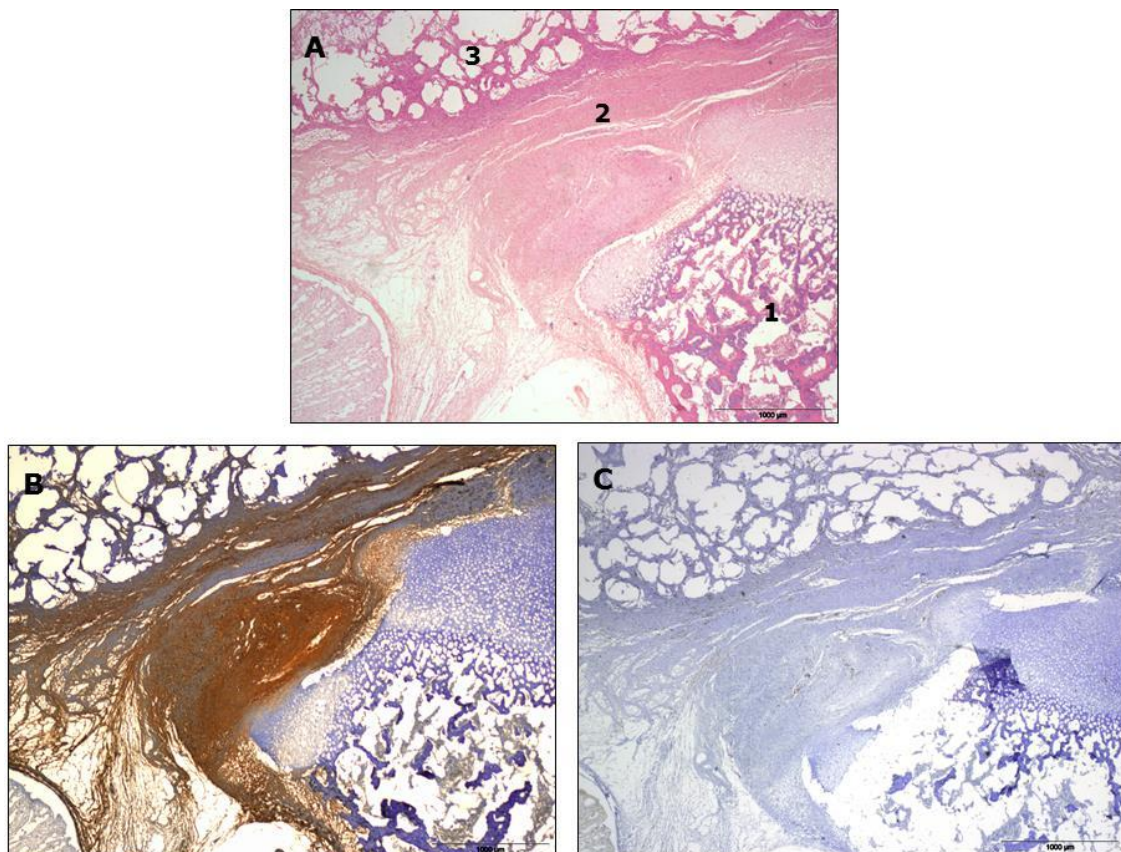


Figura 5.18. Zona de reparació del MMC de l'ovella O16: A) HE, B) Col·lagen III i C) Desmina; 1) Teixit ossi corresponent a la vèrtebra, 2) Teixit neofomat i 3) Biomatriu de PLGA.

També destacar que s'observen zones amb grans hemorràgies en relació a la pell i/o teixit connectiu i també al voltant de la medul·la en un total de quatre casos. Finalment, mencionar que s'aprecien restes de l'adhesiu biològic COSEAL[®] utilitzat durant la reparació en quasi totes les preparacions histològiques (Figura 5.19).

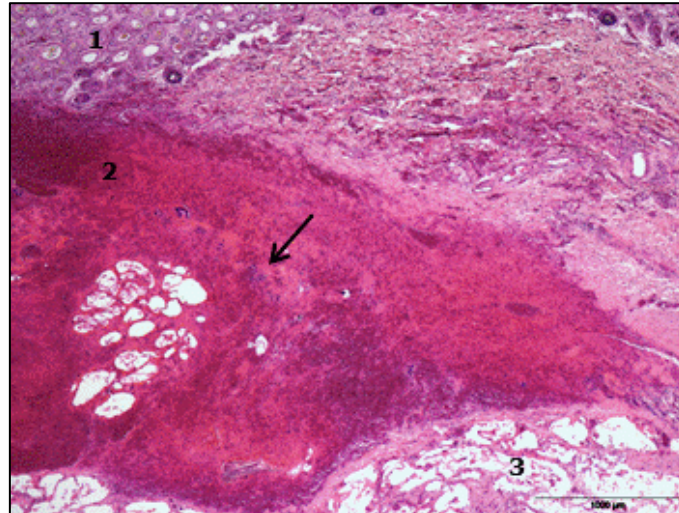


Figura 5.19. Tinció HE de la preparació histològica de la vèrtebra 7779 en la zona de reparació: 1) Pell, 2) Zona amb hemorràgia i 3) Biomatriu de PLGA colonitzada amb AF-oMSCs. S'observen restes de COSEAL[®] que s'indiquen amb fletxes negres.

5.2.6. DETECCIÓ DE LES AF-oMSCs MARCADES AMB MPIOs EX VIVO

S'avaluen els dos animals d'aquest grup experimental després de 7 i 21 dies d'evolució de la reparació. Es fa la detecció de les AF-oMSCs marcades utilitzant les metodologies que es descriuen a continuació:

5.2.6.1. Tinció de PERL'S

La Tinció de PERL's s'utilitza per evidenciar la presència de ferro intracel·lular en les AF-oMSCs i es visualitza com a coloració blavosa.

Tal com es mostra a la figura 5.20., s'observen AF-oMSCs positives pel ferro a la zona on es troba el PLGA dels animals tractats amb AF-oMSCs marcades amb MPIOs. Contràriament, no s'observen cèl·lules marcades en el teixit fibrós per sobre de la biomatriu, la qual cosa suggereix que les AF-oMSCs no han modificat la seva posició.

En la següent taula es mostra el recompte de AF-oMSCs per camp:

Ovella	Dosi AF-oMSCs marcades administrades	Temps evolució (dies)	Recompte AF-oMSCs positives per camp
1818	1,53 x10 ⁶	21	1-2
O16	2,26 x10 ⁶	7	5-10

Taula 5.7. Dosi cel·lular administrada, temps d'evolució i recompte de AF-oMSCs positives per la tinció de PERL's en els animals reparats amb PLGA i AF-oMSCs marcades amb MPIOs.

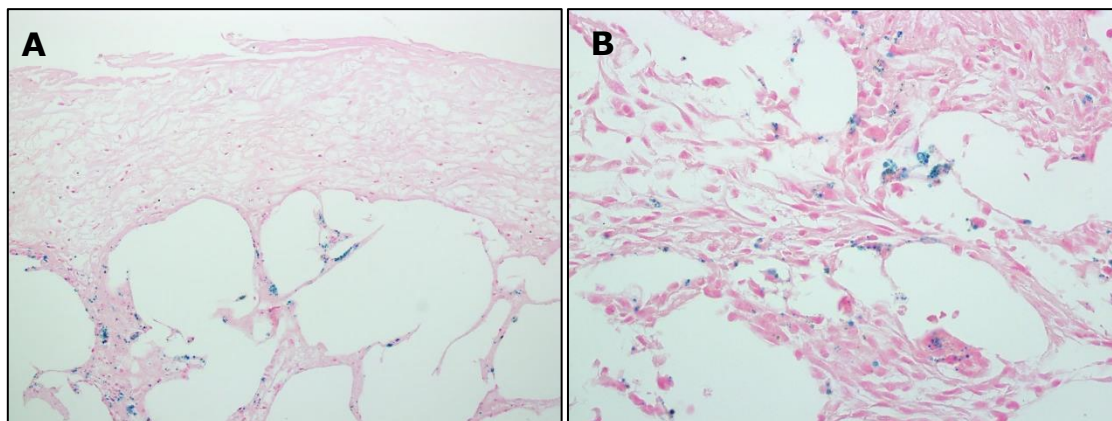


Figura 5.20. Tinció de PERL's dels talls histològics de l'ovella O16P reparada amb PLGA colonitzada amb AF-oMSCs marcades amb MPIOs. Es distingeix la coloració blava que adopta el ferro amb aquesta tinció. Les zones blanques corresponen a la matriu de PLGA. A) 20X i B) 40X.

Així mateix, s'observen macròfags amb pigment hemosiderínic que es tenyeixen positivament en la zona amb hemorràgia de l'ovella 7779, la qual s'ha reparat amb PLGA i AF-oMSCs sense marcar (Figura 5.21.).

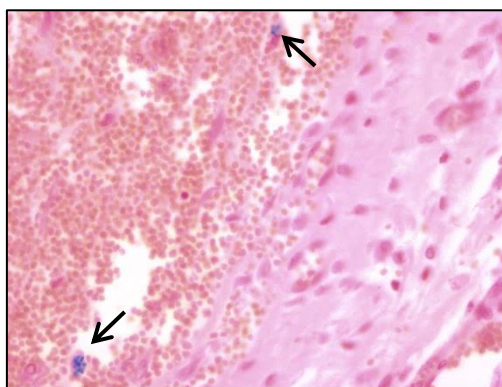


Figura 5.21. Tinció de PERL's dels talls histològics de l'ovella 7779 reparada amb PLGA colonitzada amb AF-oMSCs sense marcar. S'observa la presència de ferro intracel·lular en la zona hemorràgica.

5.2.6.2. Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)

Mitjançant aquesta tècnica no invasiva es detecta la pèrdua de senyal (tonalitat negra) en la zona del MMC en les ovelles O16 i 1818 reparades amb AF-oMSCs marcades en comparació al control (Figura 5.21. B, C i A, respectivament). El grau de pèrdua de senyal que correspon a la intensitat de marcatge és superior en l'ovella O16 que en la 1818. Aquests resultats es corresponen amb la quantitat d'AF-oMSCs positives en la Tinció de PERL's recomptades per camp.

A més a més, també s'observa una lleugera pèrdua de senyal (tonalitat grisosa) en la vèrtebra 7779 que ha sigut reparada amb PLGA i AF-oMSCs sense marcar (Figura 5.21. D) en la zona sota la cicatriu. Aquesta pèrdua de senyal coincideix amb una zona hemorràgica.

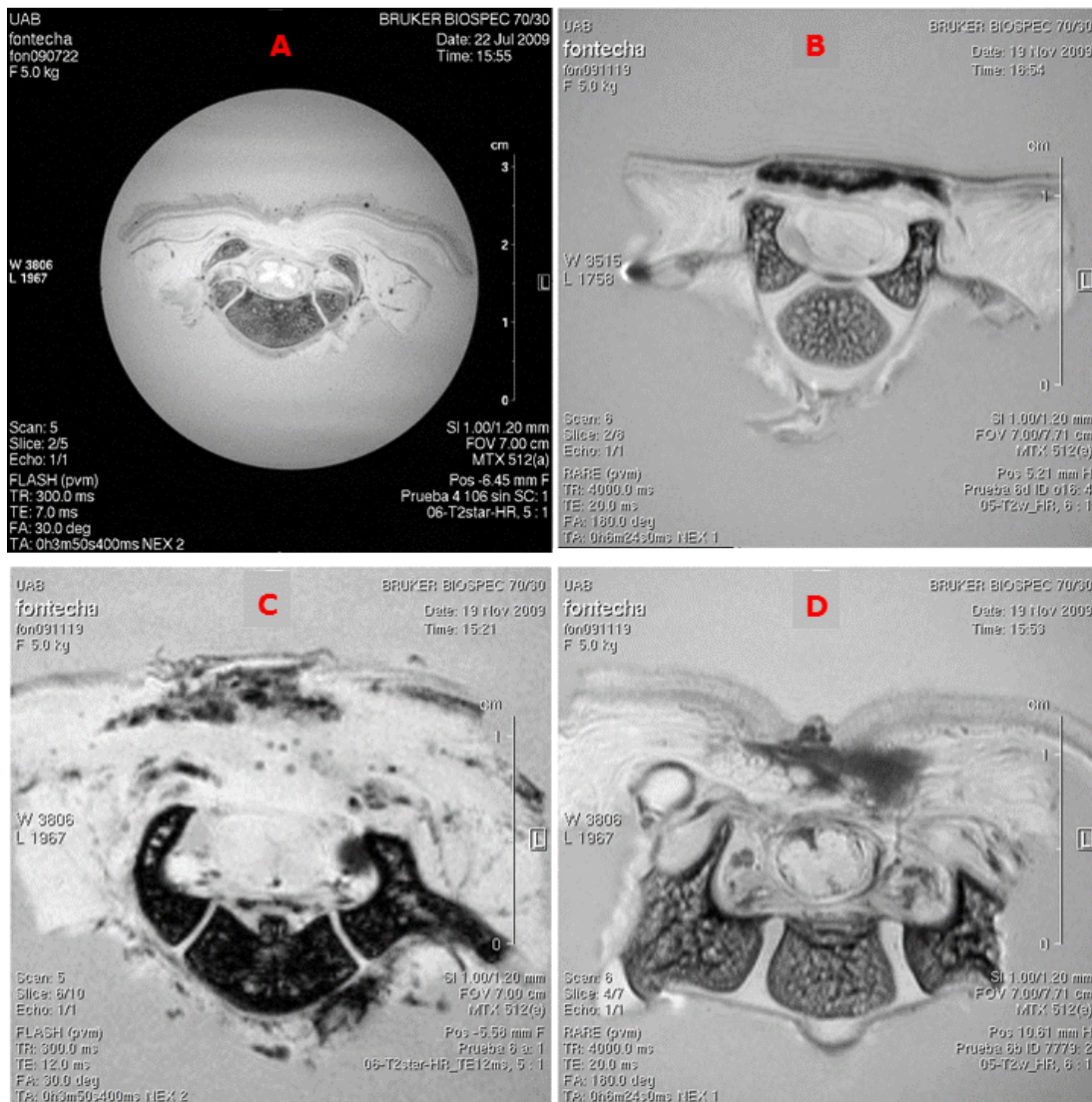


Figura 5.21. Detecció de AF-oMSCs en el teixit del nounat oví mitjançant RMN: A) Control PLGA, B) PLGA+AF-oMSCs marcades O16, C) PLGA+AF-oMSCs marcades 1818 i D) PLGA + AF-oMSCs 7779.

5.3. DISCUSSIÓ DE RESULTATS I CONCLUSIONS

En aquest capítol s'ha desenvolupat un protocol optimitzat per dur a terme la colonització de biomatrius de PLGA. S'han avaluat tres metodologies i s'ha escollit el sistema agitat fent ús de l'agitador de tubs, ja que assoleix eficiències de colonització elevades i el temps requerit per maximitzar el percentatge d'AF-oMSCs adherides a la biomatriu fixat en 16 hores s'ajusta a la disponibilitat horària del personal investigador.

En totes les produccions d'AF-oMSCs s'ha obtingut una dosi clínica entre $2-4 \times 10^6$ AF-oMSCs i el marcatge amb MPIOs s'ha fet amb una eficiència mínima del 89,4%. En un sol cas en què el temps de cultiu previ al marcatge ha estat solament de 17 dies, la dosi final ha estat de $1,86 \times 10^6$ AF-oMSCs vives. Aquests resultats confirmen que els protocols d'aïllament, expansió i marcatge de les AF-oMSCs desenvolupats en els anteriors capítols són fiables, consistents i reproduïbles.

Un cop la biomatriu ha estat colonitzada, s'ha demostrat que es pot mantenir la viabilitat de les AF-oMSCs fins al moment de la reparació mantenint-la a una temperatura de 37°C i submergida en medi basal fresc. Tot i així, s'observa que la matriu colonitzada esdevé més dura i menys mal·leable amb el temps. Això explicaria el fet que una de les biomatrius s'hagi trencat al manipular-la durant la reparació del MMC.

En aquesta fase també s'han detectat tres casos de tancament parcial espontani del MMC. Tot i que la literatura descriu la possibilitat de que es produeixi aquest fenomen en el model animal oví (137), sabem que és crític obrir àmpliament la duramàter durant la cirurgia d'inducció del MMC per evitar que es doni.

En l'estudi histològic dels fetus ovins tractats, s'observa la presència de la biomatriu de PLGA en aquells animals que han evolucionat durant menys temps. En canvi, s'observa la generació de nou teixit connectiu organitzat en els animals del grup control, que s'han recuperat com a mínim 46 dies després de la reparació. Aquests resultats confirmen, no només els estudis de degradació *in vitro* fets anteriorment pel nostre grup (135), sinó també els publicats recentment per Velasco et al. on es fixa el temps de degradació d'entre 1 i 2 mesos (55).

Desafortunadament, l'aplicació de les biomatrius de PLGA colonitzades amb AF-oMSCs no ha esdevingut un suport per a la generació de teixit muscular ni osteocartilaginós en el nostre model experimental.

L'única experiència publicada sobre la utilització d'AF-MSCs en un model animal d'espina bífida ha estat amb un model de rata i amb inducció del MMC mitjançant

àcid retinoic. En aquest estudi es reporta que la injecció directa d'aquestes cèl·lules a la cavitat amniòtica afavoreix la formació d'una capa cutània rudimentària (138). Així doncs, la combinació de les AF-oMSCs amb biomatrius de PLGA oferiria una avantatge ja que permetria la formació d'una capa tissular addicional formada per teixit connectiu organitzat entre la medul·la i la pell.

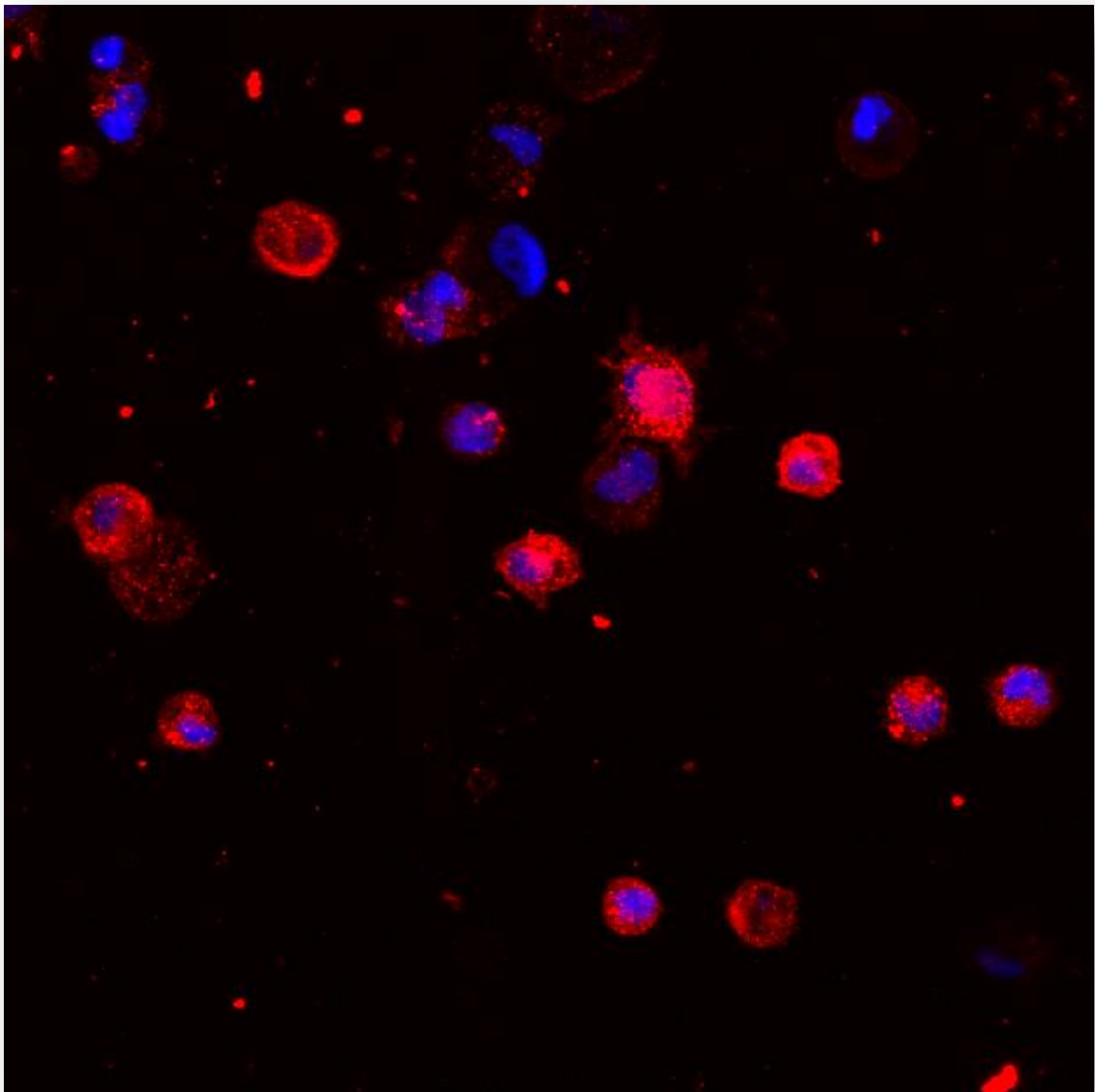
Estudis similars amb matrius sintètiques en model animal, com per exemple, el portat a terme per Saadai et al. (66) en què s'aplica nanofibres de PLA, mostra també una bona integració de la biomatriu al teixit fetal circumdant sense reacció inflamatòria o a cos estrany, però amb accentuada pèrdua de teixit neural.

En els estudis histològics dels animals tractats, s'observa una elevada freqüència de zones hemorràgiques després de la implantació de les matrius de PLGA. Una possible explicació a aquest fenomen podria ser que les biomatrius també hagin modificat la seva consistència *in vivo* abans d'iniciar el procés de degradació, fins al punt de malmetre els teixits adjacents, incloent les estructures medul·lars. Aquesta teoria juntament amb les sinèquies uterines detectades durant la cirurgia de reparació, podria explicar que la taxa de supervivència hagi estat únicament del 10%, molt menor a les generalment reportades pels grups dedicats a l'estudi d'aquesta patologia utilitzant el model oví i que se situa en el 40-70% (60, 62, 137).

Mitjançant la tinció de ferro, s'ha confirmat la presència de cèl·lules positives en la zona de reparació de tots els animals tractats amb PLGA i AF-oMSCs marcades, i aquesta coincideix amb la pèrdua de senyal en les imatges de RMN. A més, aquest senyal és més intens per l'ovella O16 a la qual es va administrar una dosi major de AF-oMSCs marcades i ha evolucionat durant únicament 7 dies.

En les zones hemorràgiques d'animals reparats amb AF-oMSCs sense marcar, s'ha detectat macròfags amb dipòsits de ferro a l'interior. El fet que les hemorràgies també s'observin com una pèrdua de senyal en les imatges ponderades en T2 i T2*, ens indica que la detecció del ferro mitjançant imatges de RMN o tincions histològiques, no és específica per la presència de les MPIOs utilitzades per marcar les AF-oMSCs. Per tant, si el model animal presenta hemorràgies en la zona reparada dificultarà el seguiment de les AF-oMSCs marcades i implantades.

Finalment, pels motius prèviament exposats, es pot concloure que les biomatrius de PLGA no són adequades pel tractament del MMC en el nostre model experimental. Així mateix, la presència d'hemorràgia a la zona del MMC pot interferir el seguiment de les AF-oMSCs marcades amb MPIOs.



CAPÍTOL 6:
REPARACIÓ PRENATAL DEL MMC UTILITZANT
BIOMATRIUS DE FIBRINA I AF- α MSCs

6.1. INTRODUCCIÓ

En l'anterior capítol s'ha demostrat que les biomatrius de PLGA poden exercir un efecte indesitjat sobre el teixit neuronal dels fetus amb MMC. A més, la seva forma i estructura no permet sempre una bona adaptació a la lesió del MMC.

Així doncs, es pensa en un tipus de biomatriu biocompatible, biodegradable, més tova i mal·leable per tal de que s'ajusti millor a la forma de la lesió del MMC.

En aquest sentit, la fibrina serveix com a suport de la reparació tissular *in vivo* després d'una ferida i es genera a través de l'activació de la cascada de la coagulació.

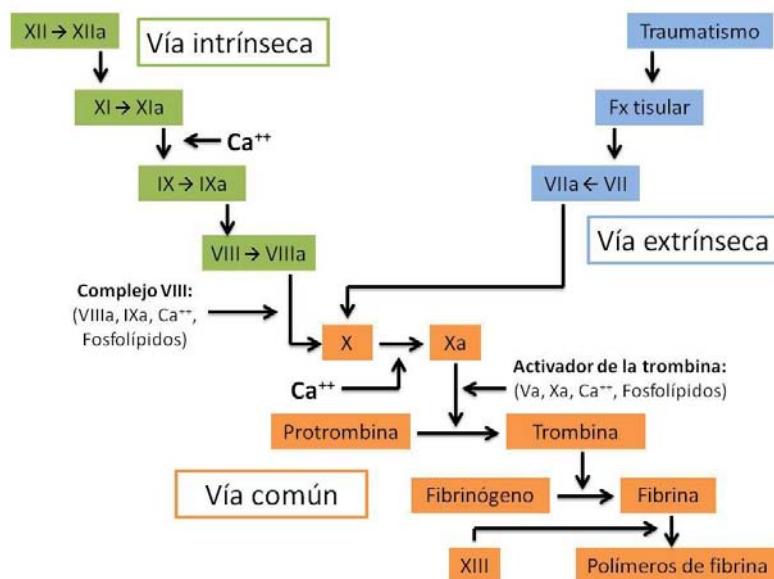


Figura 6.1. Cascada de la coagulació. En la il·lustració es descriuen les diferents vies i factors implicats (Font: <http://saulvelazquez.blogspot.com.es/2013/02/vias-y-cascada-de-la-coagulacion.htm>).

Els principals actors en la polimerització de la fibrina són el fibrinògen i la trombina. El fibrinògen consisteix en dues parelles de polipèptids, cadascuna de les quals formada per cadenes $A\alpha$, $B\beta$ i γ , i estan connectats entre si per ponts disulfur (Figura 6.2.). Les cadenes $B\beta$ i γ formen la regió D, que al seu torn s'uneix a la regió E a través del segment enrotllat. Les cadenes α s'uneixen a la regió E a través del Fibrinopèptid A (FPA) i Fibrinopèptid B (FPB).

La trombina és una proteasa present al plasma que produeix l'excisió, en primer lloc, del FPA. Els monòmers esdevenen insolubles i s'uneixen entre si donant lloc a la formació de la protofibrilla en doble hèlix. Seguidament, es produeix l'excisió de FPB que resulta en l'alliberació de la cadena α de la regió E, l'agregació lateral de les protofibrilles i, finalment, la polimerització de la fibrina. La presència dels ions

de calci catalitzen l'activitat de la trombina, la qual cosa facilita la formació d'enllaços creuats i l'estabilització de la fibrina.

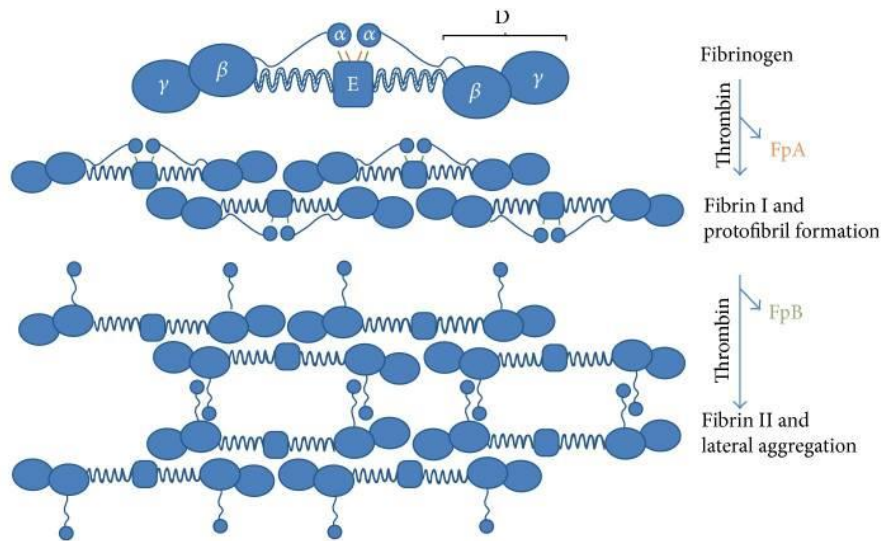


Figura 6.2. Representació esquemàtica del procés d'agregació de la fibrina. El fibrinògen està compost per dos grups de cadenes Aα, Bβ i γ. Cada cadena α està connectada amb la regió E a través de l'FPA i FPB. La regió D s'uneix a la regió E, i l'excisió de la FPA mitjançada per la trombina induïx la formació de la protofibrilla. A conseqüència, es dona l'excisió de la FPB i s'allibera la cadena α de la regió E, el que contribueix a l'agregació lateral de les protofibrilles donant lloc a la formació de la fibrina (139).

Els fibrinopèptids que s'alliberen durant la polimerització de la fibrina, són en si mateixos bioactius i contribueixen a la reparació tissular a causa de la seva activitat mitogènica, quimiotàctica i proangiogènica. Els productes de degradació de la fibrina també són coneguts com a activadors de la reparació de les ferides (140). A causa d'aquestes propietats, la fibrina esdevé un suport insoluble i proporciona al mateix temps citocines que estimulen les cèl·lules del voltant.

Les biomatrius de fibrina s'han utilitzat en una gran varietat d'aplicacions clíniques per les seves propietats, no només com a hemostàtic quirúrgic, sinó també com segellant i adhesiu de teixits.

Alguns dels productes de fibrina comercials, com per exemple el TISSEL[®] o ARTISS[®] (Baxter Healthcare Corporation) tenen l'aprovació FDA des del 1998 i el seu mecanisme d'acció, eficàcia i seguretat són coneguts (141). Aquests productes imiten l'etapa final de la coagulació amb la conversió del fibrinògen a coàgul de fibrina en presència de calci i trombina.

El gel de fibrina pot ser emprat també en el camp de l'enginyeria tissular com a vehicle tridimensional i biodegradable de les cèl·lules, ja que és fàcil de manipular,

presenta una excel·lent biocompatibilitat, mínims efectes immunògens, bones propietats mecàniques i químiques, una òptima taxa de degradació i la seva estructura permet l'adhesió cel·lular (139, 142). A més, existeixen estudis en els que s'ha reportat el manteniment de la capacitat de diferenciació osteogènica *in vitro* de les MSCs dins de biomatrius de fibrina (143, 144).

Partint de la informació exposada, es planteja emprar les biomatrius de fibrina en la reparació del MMC. Per al nostre estudi, a més, és interessant treballar amb una font, a ser possible, d'origen oví, en un context autòleg i asequible econòmicament. Per aquests motius, enlloc d'utilitzar fibrines comercials, que procedeixen de pols de plasma humà i tenen un preu elevat, es decideix utilitzar el plasma procedent de la sang perifèrica de la mateixa ovella gestant com a material de partida que, tot i no ser autòloga, té un grau de parentesc elevat. Un cop separat el plasma, és possible induir la formació del coàgul de fibrina *in vitro* mitjançant l'addició de calci a 37°C (145, 146).

Així doncs, en aquest capítol es descriu la protocol·lització de la fabricació de biomatrius de fibrina a partir de plasma oví de les ovelles gestants, la combinació del coàgul de fibrina amb les AF-oMSCs per esdevenir el seu vehicle, la seva aplicació durant la reparació del MMC i l'avaluació histològica i neurològica dels fetus tractats.

L'inici d'aquest estudi coincideix temporalment amb la finalització de la reparació MMC amb PLGA. En conseqüència, no s'havien completat les avaluacions histològiques de les ovelles reparades amb biomatrius de PLGA i AF-oMSCs amb MPIOs en el moment en que es fa la definició dels grups experimentals amb fibrina. És per aquesta raó que es manté el marcatge cel·lular amb MPIOs per fer el seguiment de les AF-oMSCs *ex vivo* i, per tant, s'inclou en aquest capítol com a un dels grups experimentals.

6.2. RESULTATS

6.2.1. PREPARACIÓ DEL CONSTRUCTE DE FIBRINA

Els constructes en forma de coàgul de fibrina utilitzen com a material de partida el Plasma Pobre en Plaquetes (PPP) procedent de sang perifèrica de les ovelles gestants tant per als estudis *in vitro* com per a la reparació del MMC i es fabriquen seguint el protocol descrit al capítol de materials i mètodes (*apartat 9.12. Preparació de les biomatrius de fibrina*).

És important destacar que previ a iniciar la fabricació dels constructes, s'ha comprovat que el PPP no coagula de forma espontània a 2-8°C, temperatura ambient ni a 37°C una vegada fraccionat. A més, també s'ha confirmat que el PPP es pot emmagatzemar durant un mínim de 48h a 2-8°C i manté estable la capacitat de coagulació al afegir el CaCl₂.

El PPP oví, en comparació a l'humà, és de color més groc pàl·lid i presenta menys terbolesa. Aquest fet no ha derivat en incidències quant a coagulació durant la fabricació dels constructes.

De forma qualitativa, s'ha observat que la presència de AF-oMSCs li dóna una major consistència al coàgul de fibrina, mantenint la mal·leabilitat.

Mitjançant una observació microscòpica del constructe, s'observa una distribució uniforme de les AF-oMSCs, tant al llarg de la superfície com en profunditat (Figura 6.3.).

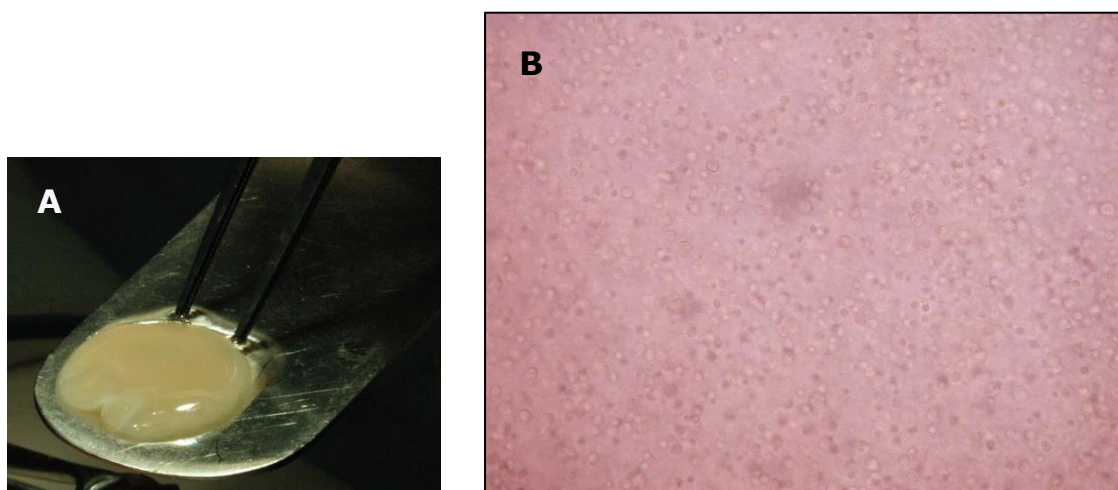


Figura 6.3. Aspecte macroscòpic (A) i microscòpic (B) del constructe de Fibrina amb AF-oMSCs un cop finalitzada la seva fabricació. A la segona fotografia s'observen les AF-oMSCs de la línia AF 306 amb morfologia arrodonida i de forma individual (10X, Ph1).

6.2.2. ESTABILITAT DE LES AF-oMSCS EN EL CONSTRUCTE DE FIBRINA

Per evitar la deshidratació del constructe i mantenir la viabilitat de les AF-oMSCs durant la seva conservació a 37°C durant unes hores, s'afegeix medi basal fresc sobre el constructe.

En primer lloc, es confirma que la consistència del coàgul es manté, i que les AF-oMSCs es troben repartides homogèniament en tot el volum que ocupa el gel de fibrina, sense migrar cap al medi que alimenta el constructe, ni adherir-se a la base plàstica de la placa de cultiu.

A continuació, es porta a terme l'estudi d'estabilitat pròpiament dit que va dirigit a avaluar si les cèl·lules romanen vives en el gel de fibrina. Es fa un seguiment mitjançant microscòpia òptica i també utilitzant microscòpia de fluorescència.

6.2.2.1. Microscòpia òptica (camp brillant)

Quant a la morfologia cel·lular, s'observa que a partir de les 12 hores al gel, les AF-oMSCs inicialment rodones comencen a estirar-se fins a adoptar la seva forma típicament fibroblàstica (Figura 6.4.).

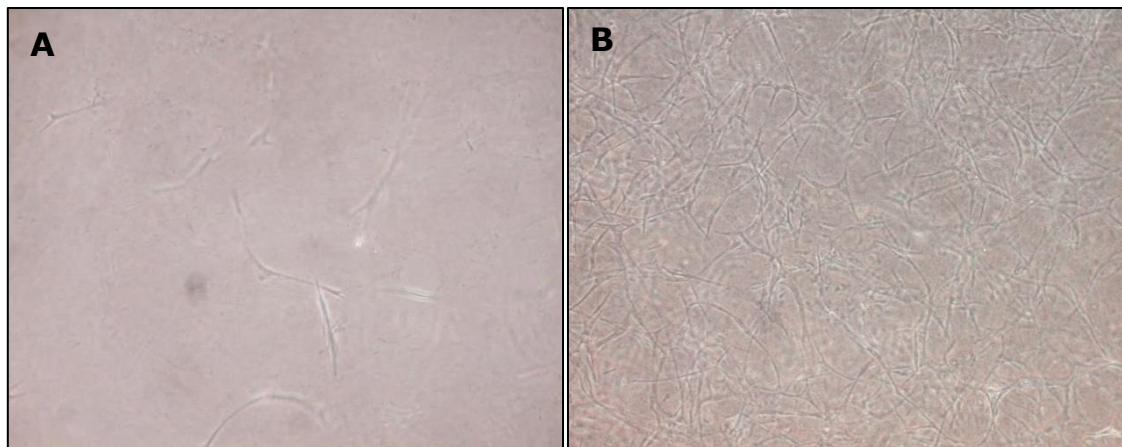


Figura 6.4. Observació de les AF-oMSCs en el gel de fibrina a les 12h (A; 20X, Ph1) i 8 dies (B; 10X Ph1) de la fabricació del constructe en el qual han format una xarxa cel·lular tridimensional.

El color del medi de cultiu que alimenta les cèl·lules vira de color rosat a taronjós, indicatiu de la presència de subproductes del metabolisme cel·lular. Si es fan canvis consecutius del medi, es veu clarament com no només les AF-oMSCs es mantenen vives sino que es multipliquen fins a formar una xarxa cel·lular tridimensional.

6.2.2.2. Microscòpia de Fluorescència

Mitjançant microscòpia de fluorescència es poden observar les AF-oMSCs de forma individual amb més definició, i distingir clarament el nucli del citoplasma cel·lular (Figura 6.5.).

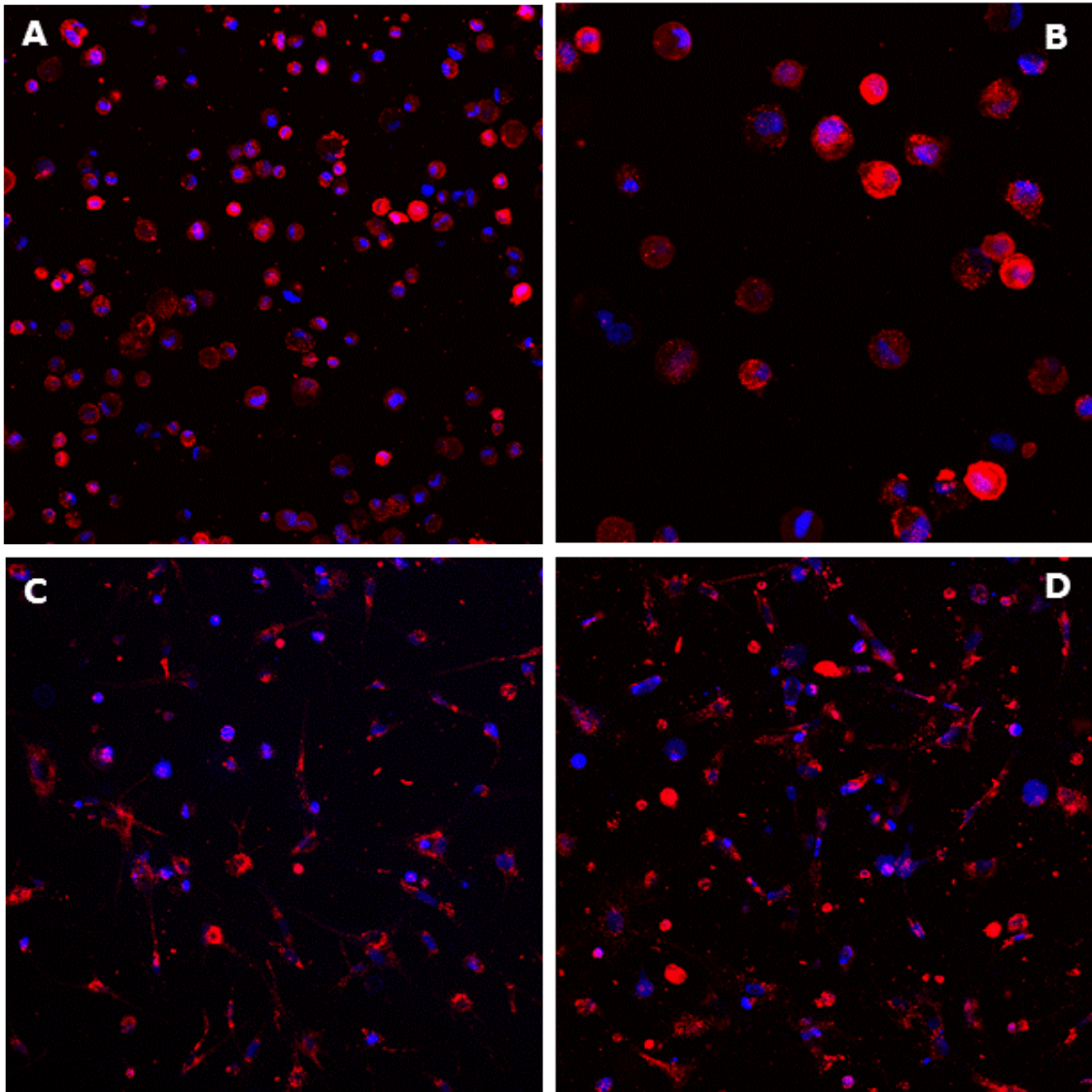


Figura 6.5. Aspecte de les AF-oMSCs 2729 en el coàgul de fibrina a les en el moment de la preparació del constructe (A, 20X i B 20X, zoom 2) i després de 4 dies (C, 20X) i 10 dies (D, 20X) de la fabricació del constructe. En vermell (PKH26) es tenyeix el citoplasma cel·lular i en blau (Vybrant® Violet DyeCycle™) el nucli cel·lular.

En aquest cas, les AF-oMSCs també són inicialment arrodonides i es troben aïllades. A mesura que passen els dies, s'observa la presència de prolongacions cel·lulars que indiquen el canvi a morfologia fibroblàstica i l'aparició de connexions intercel·lulars. Cal destacar que, tot i que el marcatge nuclear es manté, el marcatge citoplasmàtic es va perdent a mesura que avança el temps fins a no poder distingir el límit del citoplasma cel·lular en la majoria de les AF-oMSCs.

6.2.3. APLICACIÓ DE LES BIOMATRIUS DE FIBRINA I AF-OMSCS EN EL MODEL OVÍ DE MMC

S'han destinat un total de 10 ovelles gestants per avaluar aquest tipus de constructe, distribuïts en els tres grups experimentals següents:

- Grup 1: Fibrina (control), 3 animals
- Grup 2: Fibrina + AF-oMSCs, 4 animals
- Grup 3: Fibrina + AF-oMSCs marcades amb MPIOs, 3 animals

Es repeteix el procediment general utilitzat en el capítol anterior. És a dir, es porta a terme la inducció quirúrgica del MMC en el fetus oví al voltant del dia 75 de gestació, i s'aprofita aquesta etapa per recollir l'AF. Durant la cronificació de la lesió del MMC, que ocupa un període aproximat de tres setmanes, es cultiven i multipliquen les AF-oMSCs, i finalment es marquen amb MPIOs si s'escau. Després d'aquest temps, es fabriquen els constructes de fibrina contenint AF-oMSCs i es repara el MMC del fetus oví al voltant del dia 95 de gestació.

6.2.3.1. Inducció quirúrgica del MMC

En el moment de fer la cirurgia d'inducció del MMC, l'edat gestacional de les ovelles d'aquest estudi és de 75 (67-77) dies. Es recull un volum de AF de 89 (83-93) mL que es processa a les 4 (2-8) hores de l'obtenció.

La inducció quirúrgica del defecte es fa sense incidències. Només destacar que en el cas de l'ovella 28 el fetus té una mida més gran de l'esperat, la qual cosa fa pensar que probablement l'ovella gestant ha estat mal datada. Tot i així, es manté aquest animal en l'estudi pendent de la valoració final.

6.2.3.2. Aïllament, expansió i marcatge de AF-oMSCs amb MPIOs

Es processen 8 mostres d'AF per assegurar tenir dosi cel·lular per preparar els set constructes corresponents al grup experimental 2 (4 animals amb Fibrina + AF-oMSCs) i el grup experimental 3 (3 animals amb Fibrina + AF-oMSCs marcades amb MPIOs).

L'aspecte de les vuit mostres de AF rebudes és normal. En dos dels casos es detecta macroscòpicament la presència de restes de teixit (en AF 28 de color grogós, i en AF 306 de color marronós). En una de les mostres (AF 104), a més, s'observa presència d'eritròcits en la mostra un cop s'observa al microscopi.

Es sembren 80 mL d'AF en tots els casos i es mantenen en cultiu durant 10 (9-11) dies. Passat aquest temps, es recuperen $9,11 \times 10^5$ cèl·lules ($1,97 \times 10^5$ - $2,39 \times 10^6$)

al 96,5 (75,9-99,0)% de viabilitat que es ressembren per dur a terme l'etapa d'expansió de AF-oMSCs.

La següent etapa s'adequa a les dates de quiròfan disponibles per a la reparació del MMC, de manera que s'extén entre 4 i 11 dies més. Després d'aquest segon passi s'obtenen $4,06 \times 10^6$ ($2,18 \times 10^6 - 18,7 \times 10^6$) AF-oMSCs amb una viabilitat de com a mínim el 94%. Aquests valors corresponen a una densitat cel·lular en cultiu de $1,57 \times 10^4$ ($1,19 \times 10^4 - 8,00 \times 10^4$) AF-oMSCs/cm².

Les suspensions d'AF-oMSCs que corresponen al grup experimental 3 (Fibrina + AF-oMSCs marcades amb MPIOs), concretament les línies AF 633, 27 i 28, es ressembren i, aproximadament a les 24 hores, un cop les AF-oMSCs ja estan adherides a la superfície del flascó, es porta a terme la incubació amb MPIOs. El percentatge de AF-oMSCs positives pel marcatge és superior al 95,0% en les tres línies cel·lulars (Taula 6.1.):

LÍNIA CEL·LULAR	633	27	28
AF-oMSCs	$1,54 \times 10^6$	$2,37 \times 10^6$	$4,28 \times 10^6$
AF-oMSCs marcades (%)	95,5	95,7	99,1
AF-oMSCs marcades	$1,47 \times 10^6$	$2,27 \times 10^6$	$4,24 \times 10^6$

Taula 6.1. Quantitat de AF-oMSCs destinades al marcatge cel·lular, percentatge de AF-oMSCs que han internalitzat MPIOs i quantitat final de AF-oMSCs marcades.

Seguidament, es fabriquen els constructes que s'utilitzen per a la reparació del MMC en el model animal. En aquest moment, dues de les ovelles gestants del grup control (87921 i 107) han reabsorbit els fetus (Figura 6.7.). Com que estem especialment interessats en veure l'acció de les AF-oMSCs, es mantenen el número d'animals destinats al grup experimental 2 (4 animals) i grup experimental 3 (3 animals).

Per tant, es fabrica un coàgul de fibrina sense cèl·lules i set amb AF-oMSCs. La dosi cel·lular que contenen els coàguls amb AF-oMSCs és de $3,45 \times 10^6$ ($1,63 \times 10^6 - 4,28 \times 10^6$) i una viabilitat del 97,5 (93,0-99,0)%.

Tal com s'ha comentat anteriorment, no es produeixen incidències durant la fabricació dels constructes. En tots els casos, la coagulació es fa en els primers 5 minuts després de l'addició de CaCl₂ i posteriorment tots ells es mantenen alimentats amb medi M199 suplementat fins al moment de la reparació, que es dona entre 18 i 21 hores després de la fabricació dels coàguls de fibrina.

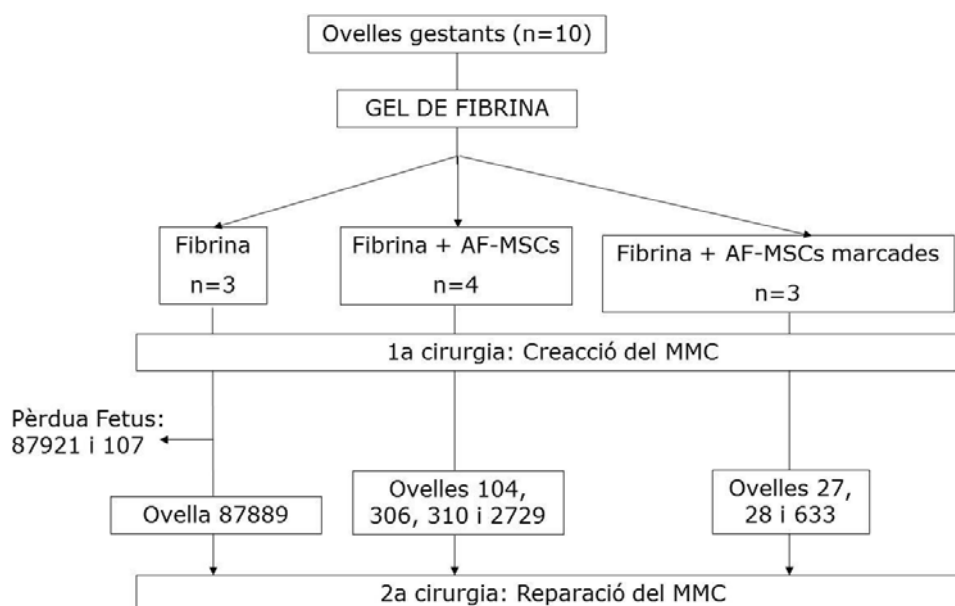


Figura 6.7. Evolució dels grups experimentals fins al moment de la reparació del MMC.

6.2.3.3. Reparació del MMC amb coàgul de Fibrina i AF-oMSCs

El tractament dels 8 animals amb MMC que es mantenen vius es duu a terme el dia de gestació 95 (88 – 100). Tal com es mostra a la figura 6.8., s'aplica el coàgul de fibrina (contenint AF-oMSCs en el grup experimental 2 i 3); es col·loca el substitut de pell Matriderm® per sobre i, a continuació, es fixa amb adhesiu biològic COSEAL®.

Com a incidències destacables, cal comentar que en dos dels casos (ovelles 306 i 28) hi havia moltes adherències de l'epipló a l'úter la qual cosa ha donat lloc a una cirurgia de reparació difícil. Per altra banda, s'observa un tancament parcial espontani del MMC en el fetus de l'ovella que es sospita una edat de gestació errònia (ovella 28). Finalment, destacar que es produeix una polimerització defectuosa de l'adhesiu biològic COSEAL® durant la reparació de l'ovella 633.

Pocs dies després de la cirurgia de reparació, dues ovelles del grup experimental 2 (Fibrina + AF-oMSCs) avorten i, quasi ja arribant a terme, també ho fa una ovella del grup 3 (Fibrina + AF-oMSCs marcades amb MPIOs) (Figura 6.7). A més, també és important esmentar que un dels nounats del grup experimental 2 es recupera mort quan es fa la cesària de l'ovella gestant i que l'únic animal del grup 1 (control) neix durant el cap de setmana i es troba mort a l'arribar el següent dilluns.

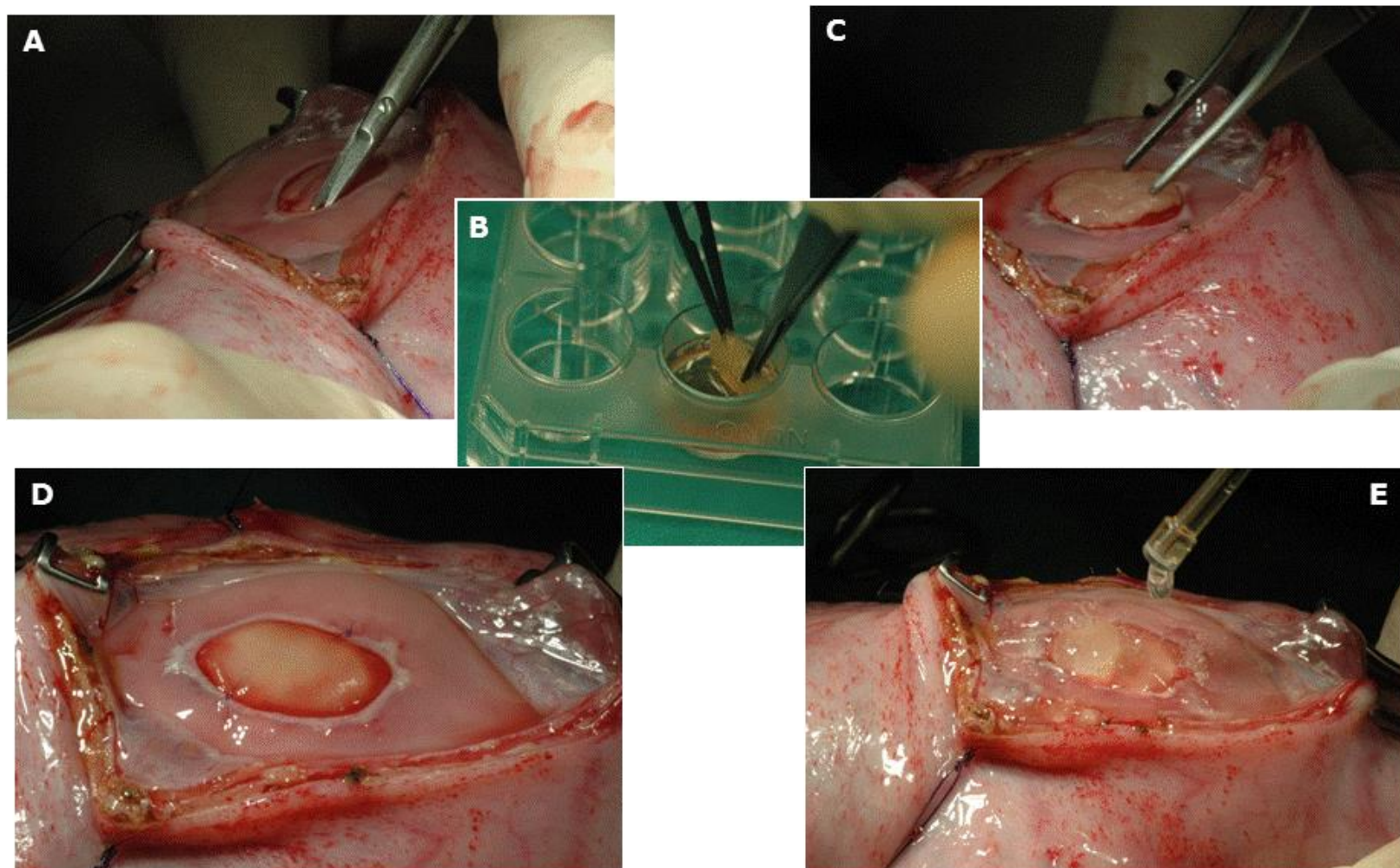


Figura 6.8. Reparació del MMC de l'ovella 633: A) Separació perifèrica de les vores de la pell per donar espai per introduir posteriorment el Matriderm®, B) Coàgul de fibrina en la placa de 12 pous alimentat amb medi basal, C) Aposició del coàgul de fibrina sobre el teixit neurològic exposat cobrint completament el defecte, D) Cobertura del constructe amb el substitut de pell Matriderm® que es situa per sota de la pell en la perifèria de la lesió, E) Segellat amb adhesiu COSEAL® cobrint el defecte i la pell perifèrica.

En conseqüència, neixen vius únicament un màxim de 3 animals dels 10 amb els que es van iniciar l'estudi (87889, 633 i 28), el que representa una taxa d'avortament del 70%.

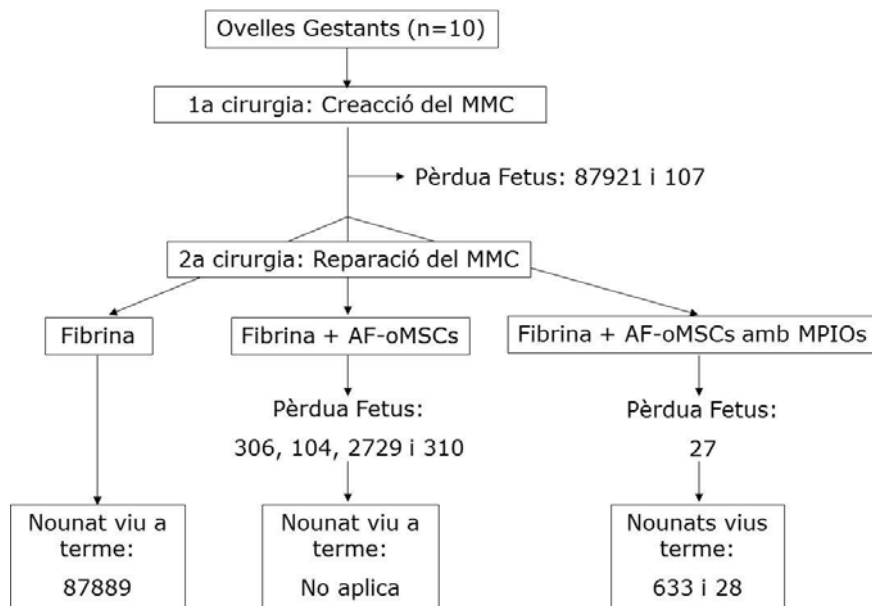


Figura 6.9. Distribució de les ovelles en el diferents grups experimentals al final de la gestació.

Els dies d'evolució del fetus des de la reparació fins al naixement es mostren en la següent taula:

OVELLA	GRUP EXPERIMENTAL	TEMPS (dies)
87889	Fibrina	48
633	Fibrina+ AF-oMSCs	49
28	marcades amb MPIOs	11

Taula 6.2. Temps transcorregut des de la reparació fins a l'obtenció del nounat viu dels animals reparats amb coàgul de fibrina.

6.2.4. AVALUACIÓ DELS FETUS OVINS TRACTATS

6.2.4.1. Avaluació motora i neurològica dels animals

Dels animals recuperats, únicament és possible fer l'exploració neurològica a un d'ells.

L'ovella 87889 neix en diumenge i el dilluns es troba morta. És important comentar que la zona del MMC es troba totalment oberta i que presenta atrofia muscular en les potes posteriors.

L'ovella 28 pateix complicacions en el moment de la reanimació del nounats durant la cesària la qual cosa impedeix dur a terme l'avaluació. Cal destacar que el defecte es veu macroscòpicament tancat en el moment de la recuperació de l'animal, i no s'observa atrofia muscular, deformitats ni hidrocefàlia.

L'ovella 633 presenta un tancament incomplet del MMC al néixer, restant aproximadament un 10% del defecte no cicatritzat (Figura 6.10.D) i pèrdua de líquid cefaloraquídi. No s'observen trastorns en la deglució, hidrocefàlia, deformitats ni atrofia muscular. Mostra reflexes muscular i anals, tot i que no es manté en posició de bipedestria i tampoc camina.

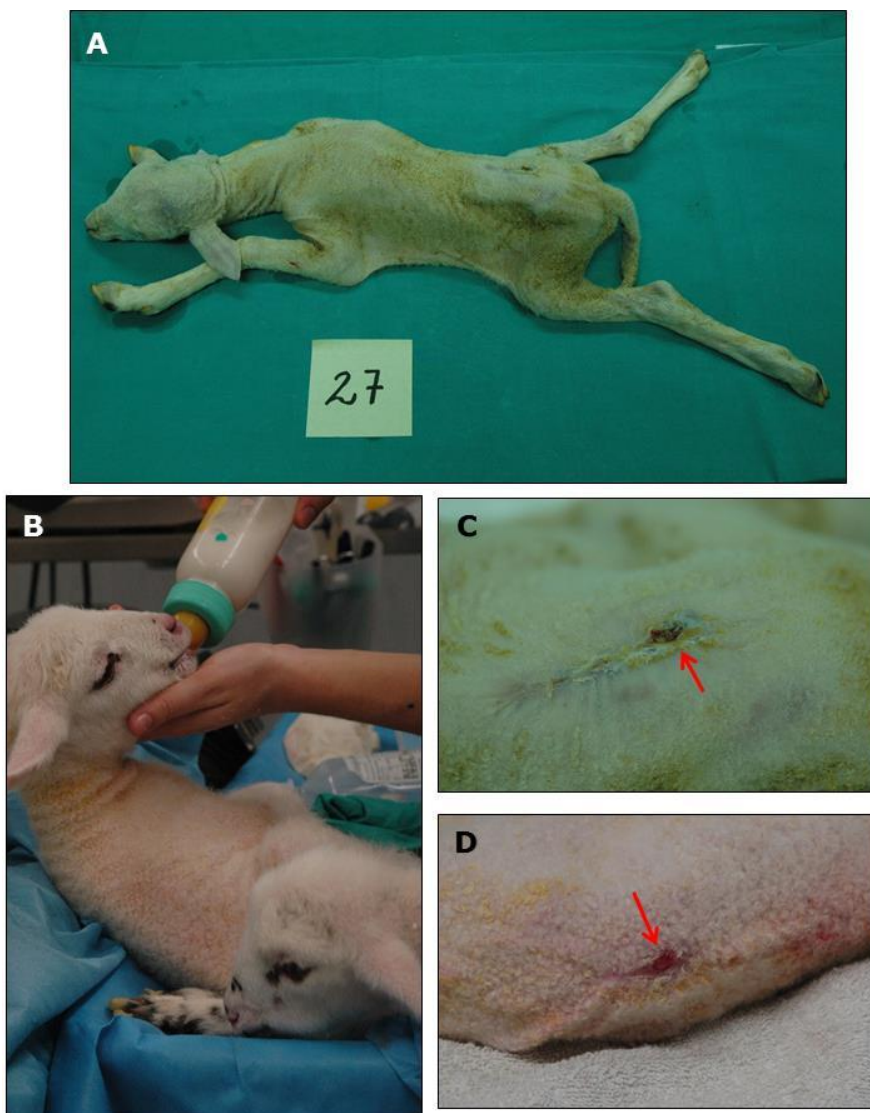


Figura 6.10. Ovelles 27 (A, C) i 633 (B, D) reparades amb coàgul de fibrina. A) Fetus avortat i recuperat mort 37 dies després de la reparació, B) Alimentació del nounat oví 633 a través de biberó amb calostre oví; C i D) Aspecte macroscòpic de la zona reparada amb coàgul de fibrina i AF-oMSCs marcades. En l'ovella 27 hi ha cobertura cutània total cobrint el MMC (C), en canvi, en el nounat 633, s'observa la presència d'una petita zona de MMC no cicatritzada (D, fletxa vermella).

Ovella	Grup experimental	Evolució (dies)	Medul·la espinal	Presència de cartílag	Presència d'os	Presència de múscul	Presència de teixit fibrós	Presència de pell	Material estrany (COSEAL®)	Hemorràgia	Congestió	Detecció de AF-oMSCs marcadés
87889	Fibrina (control)	48	Adherida al teixit fibrós	NO	NO	NO	Sí	NO	Sí	NO	Sí (Vorejant la medul·la)	NO
310	Fibrina + AF-oMSCs	8	No conservada	NO	NO	NO	Sí	NO	NO	NO	NO	NO
2729	Fibrina + AF-oMSCs	40	Adherida al teixit fibrós	NO	NO	NO	Sí	Sí (Hiperqueratòsica)	Sí	Sí (Teixit fibrós i COSEAL®)	NO	NO
633	Fibrina + AF-oMSCs marcadés	49	Adherida a la pell	NO	NO	NO	Sí (lateral)	Sí (Hiperqueratòsica)	Sí	NO	Sí (Teixit fibrós i AF-oMSCs marcadés)	Sí
27	Fibrina + AF-oMSCs marcadés	37	Aixafada i adherida al teixit fibrós	NO	NO	NO	Sí	Sí (Hiperqueratòsica)	Sí	Sí (sota medul·la)	NO	Sí
28	Fibrina + AF-oMSCs marcadés	11	Present i conservada	Sí	NO	NO	Sí	Sí (Ulcerada)	Sí	NO	Sí (Teixit fibrós)	Sí

Taula 6.3. Avaluació histològica de la zona del MMC reparada amb coàgul de fibrina i AF-oMSCs (si aplica). Per a cadascuna de les ovelles, s'identifica el grup experimental al que pertanyen, els dies des de la reparació fins a l'obtenció del nounat oví i s'avalua l'estat de la medul·la espinal, la presència de pell, múscul, cartílag, os, teixit fibrós i la detecció de cèl·lules marcadés.

6.2.4.2. Anatomia Patològica de la zona reparada

Respecte a aquest apartat, cal destacar que aquells animals que no han arribat a terme, però que s'han recuperat morts en bon estat, s'han processat per avaluar l'anatomia i formació de nous teixits a la zona reparada. Així doncs, es fan estudis histològics d'un total de 6 animals (Taula 6.3.).

Únicament en un dels casos estudiats (ovella 28), la medul·la espinal de les vèrtebres corresponents a la zona del MMC es troba en la seva localització original, amb l'estructura i la Duramàter conservades (Figura 6.11.A).

En la resta d'animals, la Duramàter està incompleta i la medul·la espinal està aixafada i/o enganxada als teixits que s'han format en la zona on s'ha disposat el coàgul de fibrina durant la reparació (Figura 6.11.B).

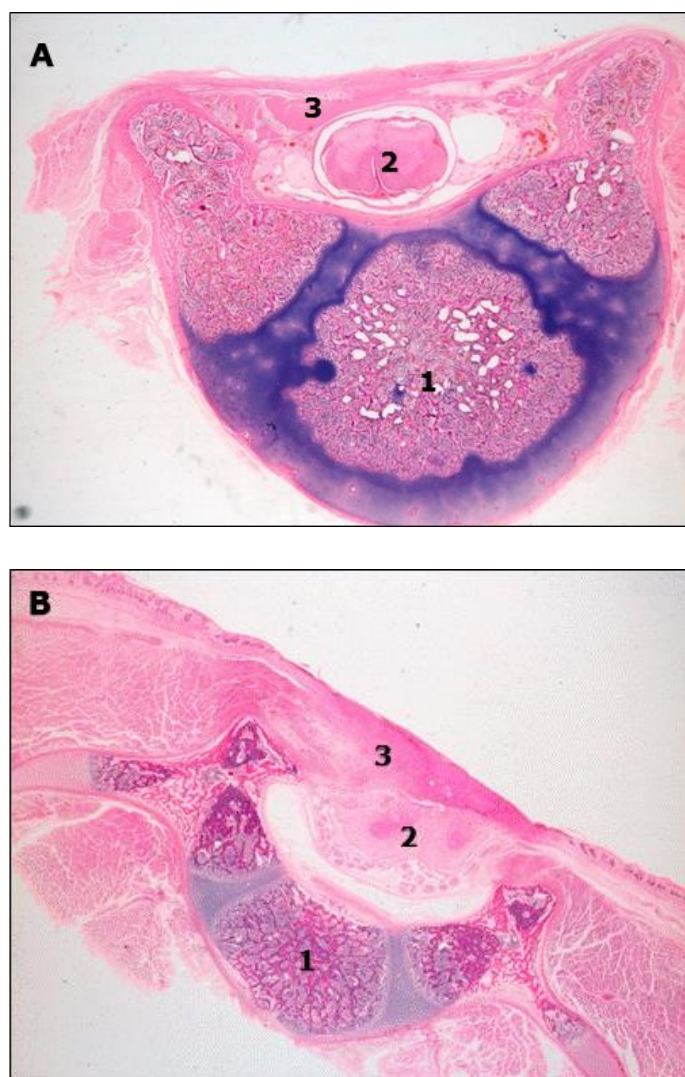


Figura 6.11. Aspecte de la vèrtebra reparada amb coàgul de fibrina: 1) Cos Vertebral, 2) Medul·la espinal, 3) Zona de reparació del MMC; A) La medul·la està separada i ben conservada (ovella 87889), B) La medul·la espinal està aixafada perdent així la seva estructura (ovella 310).

En els fetus ovins que han evolucionat durant pocs dies després de la reparació, s'hi pot apreciar clarament la presència del coàgul de fibrina en la mateixa posició on s'ha implantat (Figura 6.12.).

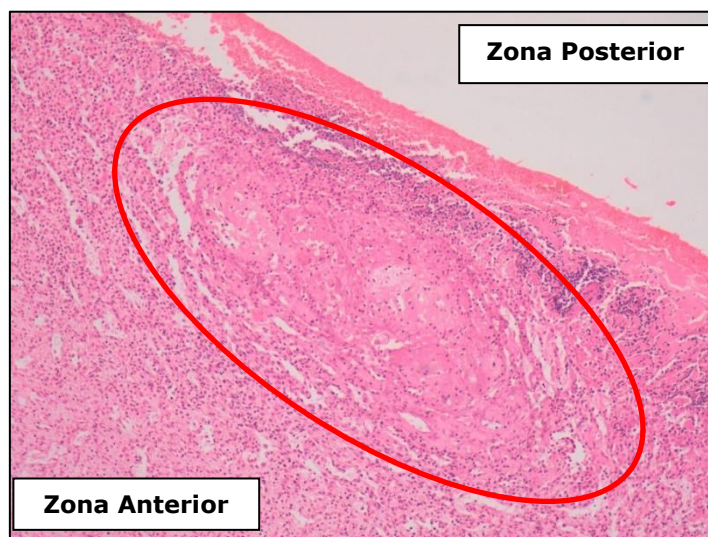


Figura 6.12. Presència de coàgul de fibrina (cercle vermell) en la zona de reparació del MMC (ovella 310, 10X).

El teixit de naturalesa fibrosa que s'ha format per sobre la medul·la espinal és molt organitzat i amb relació al múscul esquelètic lateral. Per aquest motiu, ens preguntem si pot ser múscul immadur. Per tal, de comprovar-ho es fa una tinció amb Tricròmic de Masson i immunohistoquímica per detectar desmina i col·lagen III en teixit oví.

La zona d'interès presenta positivitat pel col·lagen III però, en canvi, no hi ha presència de desmina en cap dels teixits analitzats. La tinció amb Tricròmic de Masson, a més, també indica la presència de teixit conjuntiu, per la qual cosa es conclou que és un teixit fibrós dens molt ben organitzat (Figura 6.13).

En un dels casos (ovella 28) s'ha detectat la presència d'un teixit a la zona de reparació que recorda al teixit cartilaginós (Figura 6.14.), tot i que l'estructura és més desendreçada que l'observada en el cartílag de creixement d'una vèrtebra sana. Per tal de corroborar el resultat, s'ha dut a terme la tinció immunohistoquímica del col·lagen II i el resultat ha estat negatiu. Aquest fet, juntament amb l'obtenció del fetus oví tan sols 11 dies després de la reparació, fa pensar que pugui procedir de restes quirúrgiques de la cirurgia d'inducció del MMC.

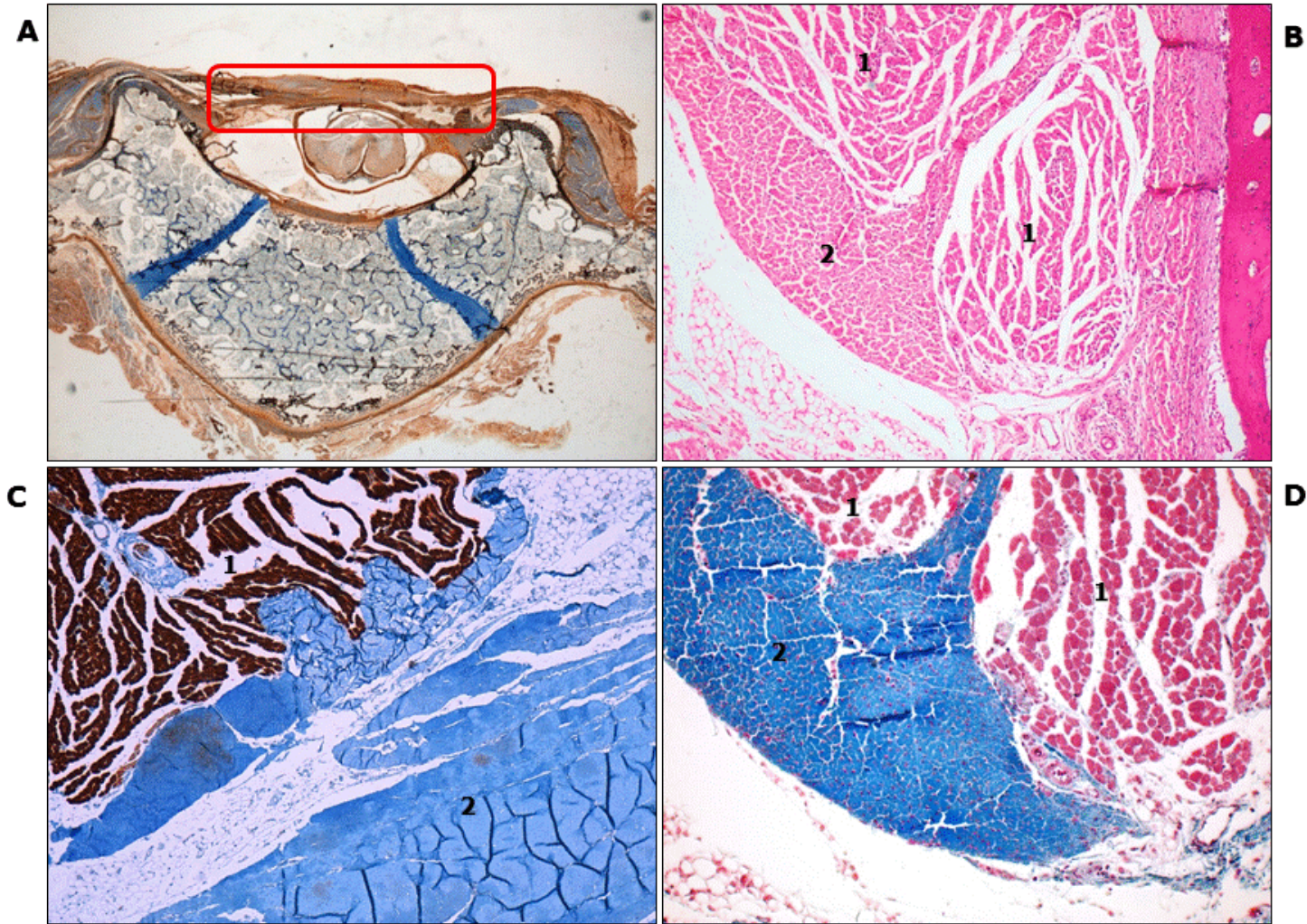


Figura 6.13. Vèrtebra reparada amb coàgul de fibrina i AF-oMSCs de l'ovella 2729: A) Tinció immunohistoquímica per a la detecció del col·lagen III 1X; Visió ampliada de la zona d'interès: B) Tinció HE 10X, C) Tinció immunohistoquímica per la detecció de la desmina D) Tinció Tricròmic de Masson 20X; 1) Múscul esquelètic perivertebral, 2) Teixit fibrós organitzat.

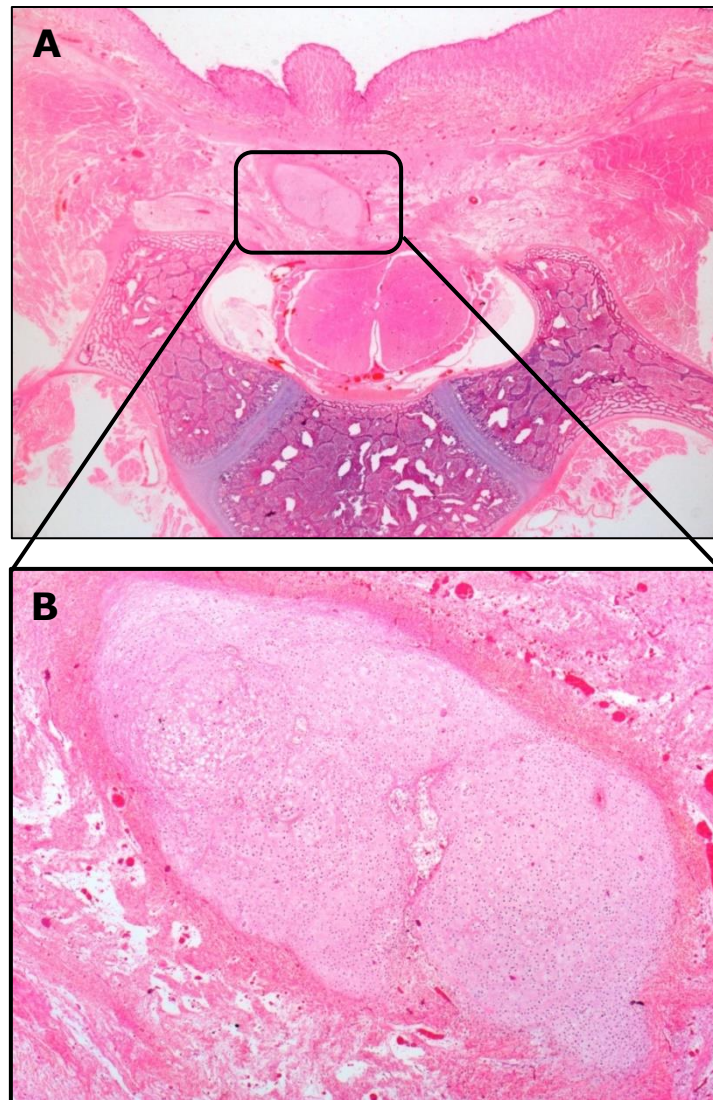


Figura 6.14. Tinció HE de la vèrtebra reparada amb coàgul de fibrina i AF-oMSCs marcades del fetus oví 28 a (A; 1X) i ampliació de la zona d'interès a (B; 4X).

També es detecta la presència de restes de l'adhesiu biològic en forma de fibres de color lilós entre el teixit conjuntiu i la pell, tal com es mostra en la figura 6.15.

Per altra banda, s'observa congestió vascular en tots els teixits de la zona reparada, la qual cosa forma part del procés inflamatori.

També s'observa la presència de pell i l'epidermis en quatre dels cinc animals reparats amb AF-oMSCs (grups experimentals 2: 310 i 2729; grup experimental 3: 633, 27 i 28), i en tres d'ells aquesta és hiperqueratòsica (Figura 6.16.; fletxes vermelles). Contràriament, a aquesta hi manca en l'animal del grup control processat (87889).

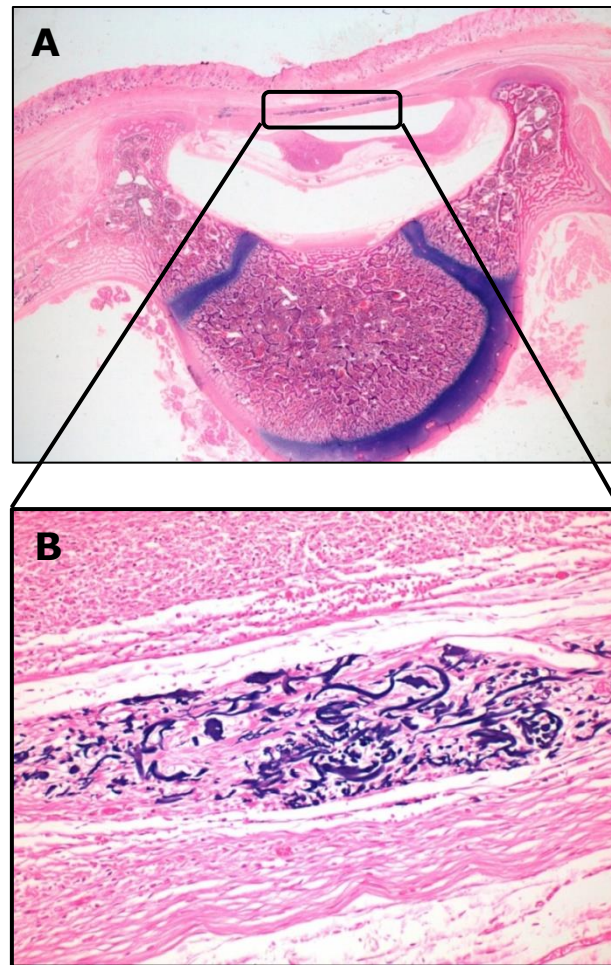


Figura 6.15. Presència de restes d'adhesiu biològic a la zona de reparació per sota la cobertura cutània. Mitjançant la tinció HE s'observen com a fibres de color lilós (Ovella 2729 A) 1X B) 20X).

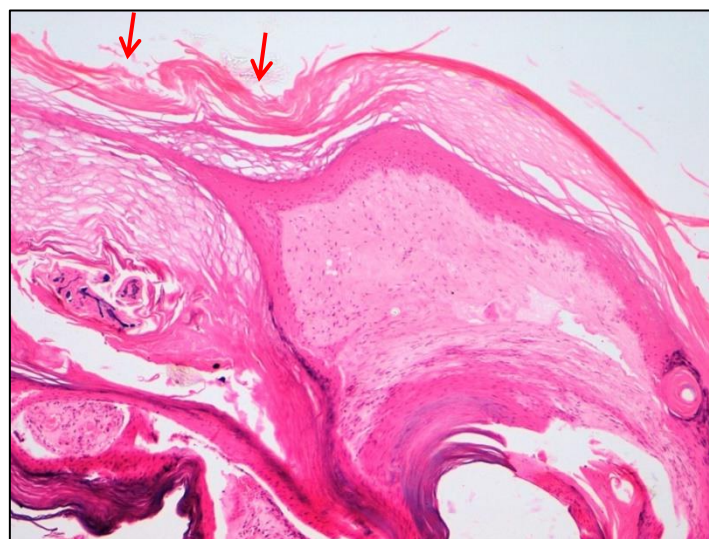


Figura 6.16. Observació de pell amb hiperqueratosi en la tinció amb HE (Ovella 633, 10X).

6.2.4.3. Detecció de les AF-oMSCs marcades amb MPIOs in vivo

A) Tinció de PERL'S:

S'ha fet tinció de PERL's de totes les ovelles processades per estudiar la presència de ferro procedent de les MPIOs.

No s'han observat cèl·lules positives per aquesta tinció en les ovelles dels grups experimentals 1 (control) i 2 (Fibrina + AF-oMSCs). Pel contrari, si que es detecten cèl·lules positives en les tres ovelles reparades amb coàgul de fibrina i AF-oMSCs marcades amb MPIOs (ovelles 27, 28 i 633).

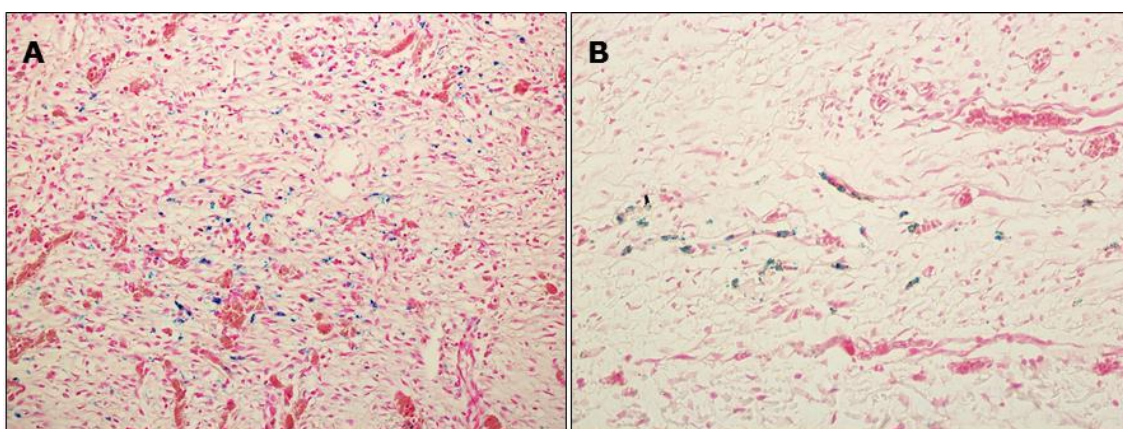


Figura 6.17. Presència de cèl·lules positives per la tinció de PERL's (color blau), indicant presència de ferro intracel·lular: A) Ovella 28, 20X, B) Ovella 633, 40X. En ambdós casos s'observa congestió vascular en la zona de reparació del MMC.

A continuació, es recompten les cèl·lules positives pel ferro en les tres ovelles reparades amb AF-oMSCs marcades i és el següent:

Ovella	Dosi AF-oMSCs marcades	Temps d'evolució (dies)	AF-oMSCs positives per camp
633	1,47 x10 ⁶	49	29
27	2,27 x10 ⁶	37	32
28	4,24 x10 ⁶	11	250

Taula 6.4. Valors de recompte de les cèl·lules positives en la tinció de PERL's dels talls histològics de les ovelles reparades amb AF-oMSCs marcades amb MPIOs.

L'ovella 28, que ha nascut només 11 dies després de la reparació i es va tractar amb una dosi superior a 4x10⁶ AF-oMSCs marcades, presenta 250 AF-oMSCs positives per camp. En canvi, els casos 633 i 27, que evolucionen durant un major

període de temps i es van reparar amb una dosi cel·lular menor, es recompten només 29 i 32 AF-oMSCs positives, respectivament. A més, és important mencionar que en l'ovella 27 s'observen cèl·lules histiocitàries (macròfags) amb material positiu dins.

B) Ressonància Magnètica Nuclear (RMN):

Primerament, destacar que no hi ha hagut incidències en la preparació de les mostres. S'ha aconseguit incloure les vèrtebres ovines dins el gel d'agarosa evitant l'aparició de bombolles d'aire que podrien interferir en l'anàlisi de les mostres.

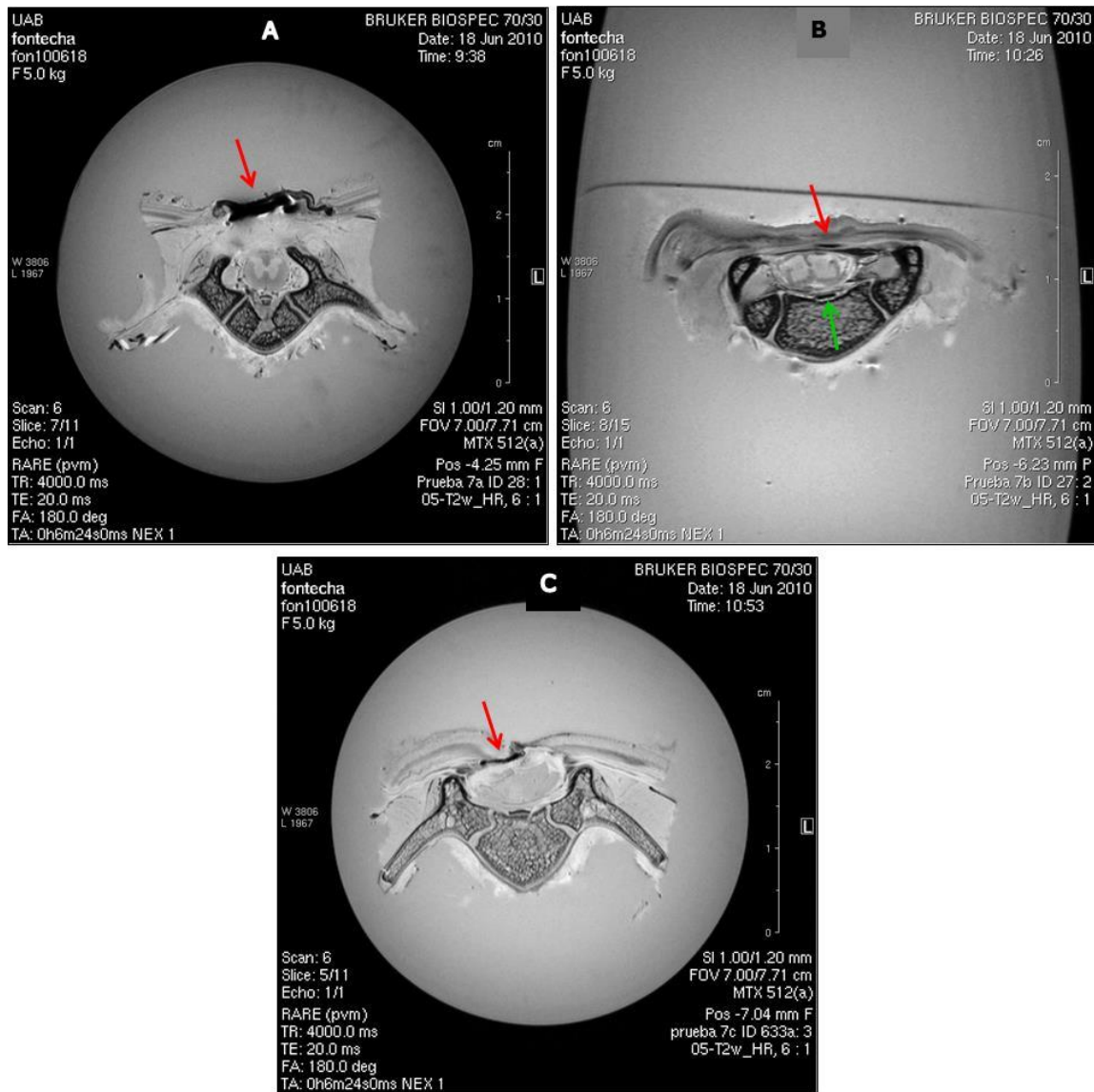


Figura 6.18. Imatge de RMN de les vèrtebres reparades de les ovelles 28 (A), 27 (B) i 633 (C). La pèrdua de senyal associada al marcatge de les AF-oMSCs amb MPIOs adopta coloració negra a la zona de reparació del MMC (A-C; fletxa vermella) i és similar en les zones amb d'hemorràgia (B; fletxa verda).

L'anàlisi dels teixits ovins mitjançant RMN evidencien pèrdua de senyal a la zona de reparació del MMC associada a la presència de ferro, en totes les ovelles que s'han reparat amb AF-oMSCs marcades amb MPIOs (Figura 6.18. A, B i C; fletxa vermella). En dos casos la pèrdua de senyal és molt clara (ovelles 27 i 28), i en el tercer cas és menor (ovella 633).

En aquestes mostres, com també passava en la reparació amb PLGA, també veiem zones amb pèrdua de senyal que corresponen a hemorràgia amb un grau comparable allà on hi trobem AF-oMSCs marcades, com per exemple, la zona per sota la medulla espinal de l'ovella 27 (Figura 6.18. B; fletxa verda).

6.3. DISCUSSIÓ DE RESULTATS I CONCLUSIONS

En aquest capítol, s'ha estudiat la reparació del MMC mitjançant l'aplicació de biomatrius de fibrina i AF-oMSCs.

A partir de la resuspensió de les AF-oMSCs en PPP de l'ovella mare gestant activat amb CaCl_2 , s'han fabricat biomatrius tridimensionals sense incidències i amb les característiques adequades per dur a terme la reparació prenatal del MMC.

També s'ha confirmat que les AF-oMSCs no només es mantenen vives en el constructe si està alimentat amb medi de cultiu, sinó que, a més, s'hi poden multiplicar i formar una xarxa cel·lular tridimensional en el seu interior. Aquesta observació es correspon amb treballs que reporten la morfologia típicament allargada i fibroblàstica de les MSCs, així com la proliferació de MSCs dins els coàguls de fibrina (144, 147). Aquest fet s'ha relacionat amb la polimerització de la fibrina a partir de concentracions òptimes de fibrinogen i trombina que donin lloc a la formació de porus interns amb una mida, estructura i grau d'homogeneïtat adequada per a la penetració, adhesió i creixement cel·lular (148). A més, el constructe de fibrina manufacturat utilitzant el nostre protocol ha demostrat ser suficientment permeable per permetre el transport de nutrients, i l'intercanvi de gasos, i adaptar-se a l'ambient mecànic, factors claus en el context de la reparació tissular (149).

L'avaluació de les mostres dels animals tractats revela que la conservació de l'estructura de la medul·la espinal s'ha produït en un sol cas (1/6). Aquest resultat és equivalent a l'obtingut en la reparació utilitzant biomatrius de PLGA (2/7) i podria estar associat al fet que durant la cirurgia de reparació no es porta a terme la reconstrucció del placode neural, ni tampoc el tancament de la duramàter.

Malauradament, la zona de reparació del MMC no presenta la generació de teixits com el múscul, el cartílag o os, però sí que en tots els animals es genera una banda de teixit fibrós dens i organitzat per sobre la medul·la espinal. Aquesta dada és interessant perquè posa de manifest que aquest tipus de constructe no presenta toxicitat i que ha donat lloc a una capa tissular que evita la sortida del líquid cefaloraquídi i possiblement també l'empitjorament estructural i funcional del teixit neuronal durant la gestació.

També és important mencionar que només en un dels sis animals processats s'ha observat hemorràgia en la zona de reparació del MMC. La incidència d'aquest fenomen utilitzant biomatrius de PLGA era superior (4/7), pel que es pot afirmar que la fibrina té una acció menys agressiva que el PLGA en la zona de reparació.

La presència de cobertura cutània s'ha donat únicament en animals reparats amb AF-oMSCs, per tant, és raonable suposar que les cèl·lules poden tenir un efecte positiu en aquest sentit. A més, el temps d'evolució del fetus després de la reparació fins a la seva obtenció podria tenir un efecte sinèrgic a la presència de AF-oMSCs, ja que, s'observa la pell regenerada en els animals que s'han mantingut com a mínim 37 dies.

Per altra banda, i tal com han evidenciat els estudis histològics (tinció de PERL's) i mitjançant RMN, de nou hem sigut capaços de detectar les cèl·lules marcades amb MPIOs en la zona de reparació. A més, el marcatge ha demostrat ser estable com a mínim 49 dies utilitzant la biomatrius de fibrina com a suport de les AF-oMSCs en el model oví.

Els experiments anteriors també revelen que les AF-oMSCs marcades i administrades en la zona de reparació del MMC persisteixen en la posició on s'ha ubicat el constructe de fibrina. La informació sobre la persistència i biodistribució de les AF-oMSCs implantades en el model animal és clau, sobretot, si l'objectiu final és el desenvolupament d'un producte de teràpia avançada per a aplicació en l'humà (150).

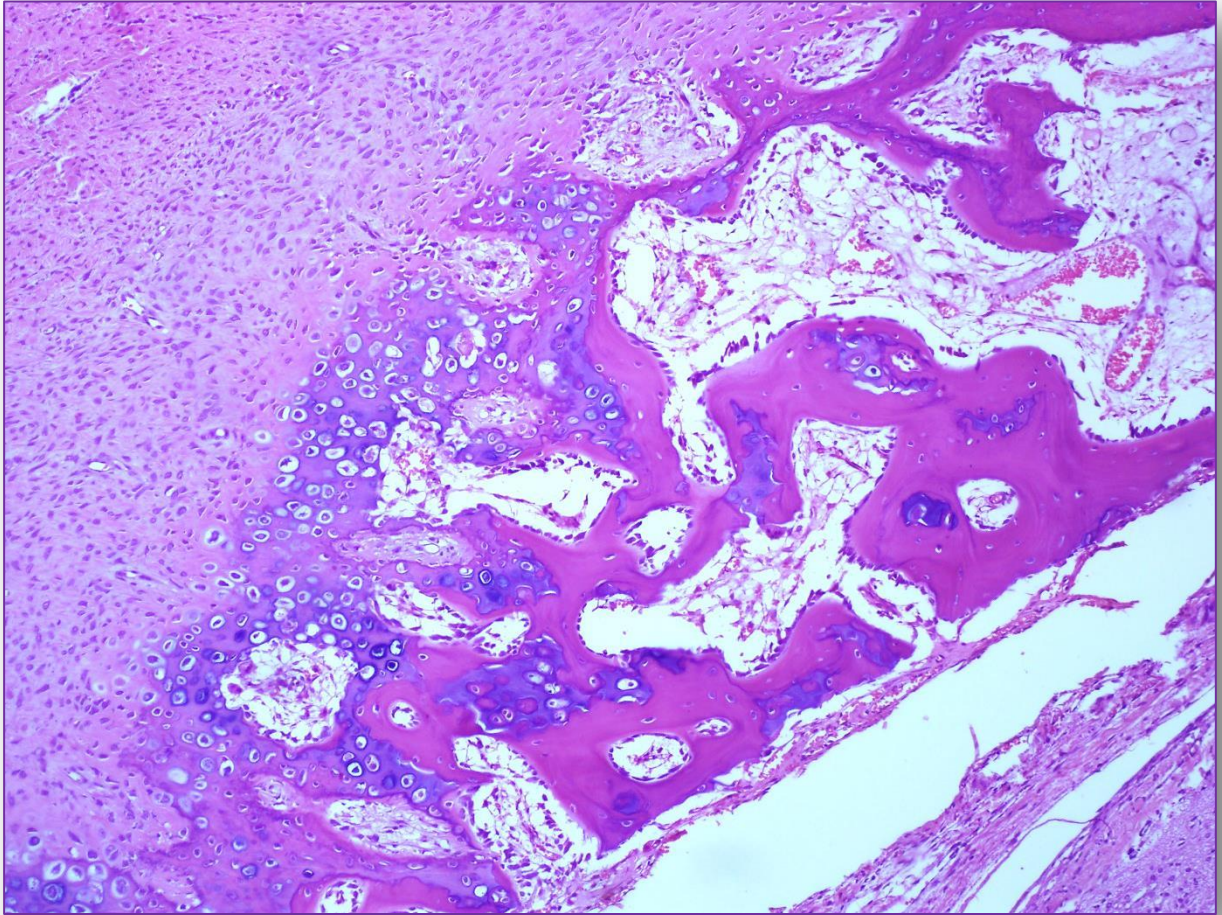
L'avaluació histològica de les ovelles 27 i 633 mostra presència d'hemorràgia i congestió, respectivament, en la zones de reparació. En aquests casos, no es pot discriminar a través del estudis amb RMN si la pèrdua de senyal observada prové pel marcatge amb MPIOs o de l'hemoglobina del vasos. En la tinció de PERL's de l'ovella 27 també s'observen cèl·lules histiocitàries (macròfags) amb material positiu dins. Per tant, es confirma que caldria acompanyar el marcatge de MPIOs amb una tinció IHQ utilitzant un anticòs específic per a MSCs ovines, i així poder confirmar que les cèl·lules que donen senyal són AF-oMSCs marcades i no pas un altre tipus cel·lular. En el moment que es va dur a terme aquesta part experimental, es va fer una recerca intensiva en aquest sentit i no es va trobar al mercat cap reactiu comercial específic per a les MSCs de l'espècie ovina. Per aquest motiu, es decideix descartar les MPIOs com a mètode per al marcatge i seguiment de les AF-oMSCs en el model experimental oví.

L'experiència en la utilització de la fibrina per a la reparació del MMC és limitada. De fet, no hi ha cap estudi publicat on s'hagi aplicat biomatrius de fibrina directament sobre el MMC, sinó que en la literatura s'utilitza la fibrina com a segellant extern una vegada reparat el MMC amb materials com el pegat de pericardi boví (31).

La reparació del MMC amb constructes de fibrina ofereix una avantatge a la utilització de membrana amniòtica publicada recentment per Brown E.G. et al. on, tot i que reporta la preservació substancial del teixit neuronal, la membrana amniòtica no s'integra en el teixit natiu, i a més, no es produeix la regeneració de la pell (69). D'altra banda, els resultats obtinguts són comparables als prèviament publicats anteriorment pel nostre grup en què s'utilitza un pegat de Silastic i malla de Marlex recobert pel segellant COSEAL® (63, 64).

També resulta interessant ressaltar que en aquesta fase del projecte s'han recollit dues incidències relacionades amb la reproducció de la tècnica quirúrgica d'inducció i reparació del MMC que poden tenir un repercussió important en els resultats obtinguts. En primer lloc, s'ha donat de nou un cas de tancament espontani de part del MMC. I per altra banda, s'ha observat un defecte de tancament del MMC en l'ovella 633 en la que es va produir un problema de polimerització del segellant COSEAL® durant la cirurgia de reparació. La retirada del segellant defectuós i la substitució per un altre amb polimerització correcta podria resoldre la incidència.

Per concloure, les biomatrius de fibrina són adequades per vehiculitzar les AF-oMSCs a la zona de reparació, ja que són biocompatibles, biodegradables, permeten la supervivència i proliferació de les AF-oMSCs en el seu interior, i s'adapten satisfactòriament a lesió del MMC. Tot i això, la seva utilització no esdevé en la generació de teixits durs altament interessants com són el cartílag o l'os en la zona de reparació del MMC.



CAPÍTOL 7:
REPARACIÓ PRENATAL DEL MMC UTILITZANT MARIU
ÒSSIA DESMINERALITZADA, FIBRINA I AF- σ MSCs

7.1. INTRODUCCIÓ

En l'anterior capítol s'ha estudiat la reparació del MMC amb biomatrius de fibrina i s'ha comprovat que són un bon vehicle per administrar les AF-oMSCs a la zona del defecte. Tot i així, el teixit resultant, format per un teixit connectiu organitzat i una cobertura cutània regenerada, no compleix les característiques d'un teixit que pugui servir com a suport estructural o punt d'ancoratge per implants metàl·lics en futures intervencions quirúrgiques.

Per aquesta raó es planteja la necessitat d'afegir un nou component a la biomatriu que d'una banda serveixi com a suport de les AF-oMSCs i, per l'altra, aportï factors de senyalització que condueixin les cèl·lules a un llinatge osteocondrogènic.

Les estratègies d'enginyeria tissular esquelètica contempnen la utilització d'empelts sintètics i també biològics. En aquest sentit, la matriu òssia desmineralitzada (*Demineralized Bone Matrix* "DBM") al·logènica s'utilitza habitualment en la cirurgia ortopèdica o maxil·lofacial en aplicacions tan diverses com la fusió espinal, la pseudoartrosi, en artroplàstia de genoll i maluc, la reconstrucció mandibular i la reparació del sinus frontal, entre d'altres (151, 152).

Aquesta tipus de biomatriu destaca per les següents característiques (153, 154):

- Proporciona un suport osteoconductor natural que promou l'adhesió i proliferació cel·lular, així com la neovascularització.
- Proporciona senyals osteoinductives, proliferatives i quimiotàctiques com la BMP-2, BMP-4, BMP-7, TGF, PDGF, IGF-1 i FGF-1.
- Estimula la migració cel·lular i la diferenciació dels teixits circumdants.

La utilització del DBM liofilitzat ofereix la possibilitat de modificar la seva consistència ajustant la quantitat de líquid per hidratar-lo, de tal forma que es pot aconseguir des d'una consistència més dura fins a una més fluida en forma de gel. A més a més, el DBM, al ser hidrofílic i porós, pot absorbir i retenir fluids bioactius com la sang, l'aspirat de moll d'os, el plasma ric en plaquetes o suspensions cel·lulars diverses.

Així doncs, en aquest capítol es testaran biomatrius manufacturades a partir d'una amalgama de DBM, fibrina i AF-oMSCs. El volum de plasma emprat per hidratar el DBM tindrà com a objectiu obtenir una consistència apropiada per tal d'evitar malmetre el teixit neuronal.

Un cop implantat el constructe, les AF-oMSCs poden colonitzar els xips de DBM, diferenciar a osteoblasts *in vivo* i sintetitzar matriu òssia, o per contra, tenir una acció de

tipus paracrí amb una efecte crida a altres cèl·lules amb capacitat osteogènica *in vivo* (155). Per esbrinar si les cèl·lules responsables d'una eventual regeneració del teixit ossi són les AF-oMSCs administrades, és imprescindible fer-ne el seguiment en la zona de reparació del MMC.

A tal efecte, un dels grups experimentals es destinarà al seguiment de les AF-oMSCs *ex vivo*. Tal com s'ha explicat en capítols anteriors, existeixen diversos mètodes de marcatge i seguiment cel·lular. En aquest capítol s'aplicarà un sistema basat en la producció de vectors virals pantròpics que codifiquen per la Proteïna Verda Fluorescent (*enhanced Green Fluorescent Protein, eGFP*) i la posterior transducció de les AF-oMSCs per aconseguir l'expressió d'aquesta proteïna. Aquest mètode permet el marcatge i seguiment de les cèl·lules de forma estable, específica i a llarg termini.

7.2. RESULTATS

7.2.1. FABRICACIÓ DELS CONSTRUCTES AMB MATRIU ÒSSIA DESMINERALITZADA I FIBRINA

Els constructes de DBM, fibrina i AF-oMSCs es fabriquen tal com es descriu en l'apartat 9.13 del capítol de Materials i Mètodes. Per a la reparació del MMC es fabriquen dos tipus de constructes:

- A) El primer constructe que conté els tres components (DBM, fibrina i AF-oMSCs) i es fraccionarà en tres làmines en el moment de la reparació del MMC. El volum de plasma per volum de DBM utilitzat dóna lloc a una consistència tipus "putty" (pastosa).
- B) El segon constructe únicament conté fibrina i servirà per omplir l'espai entre les làmines anteriors.

L'aspecte macroscòpic dels constructes es mostra en la següent imatge:

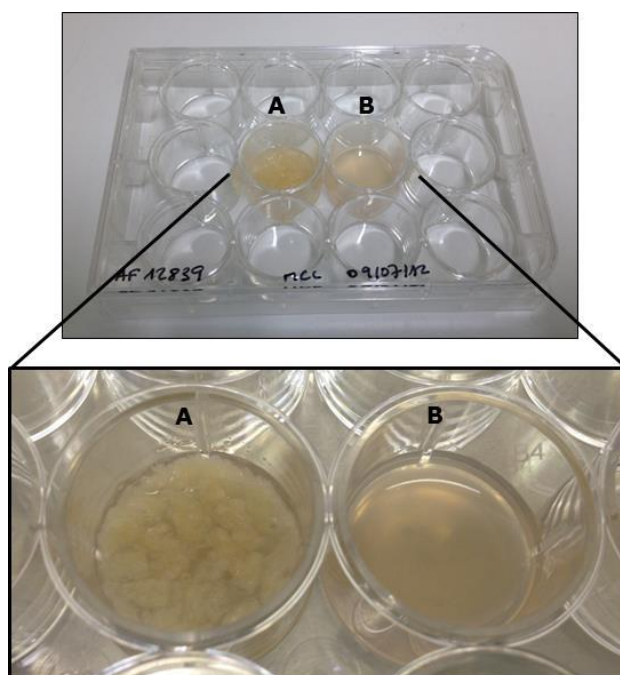


Figura 7.1. Aspecte macroscòpic dels constructes fabricats amb AF-oMSCs, DBM i Fibrina (A) i Fibrina (B).

7.2.2. ESTABILITAT DE LES AF-oMSCs EN EL CONSTRUCTE DE FIBRINA

S'avalua la morfologia mitjançant microscòpia confocal de fluorescència de les AF-oMSCs en el constructe de DBM i Fibrina alimentat amb medi basal i mantingut a 37°C, 5% de CO₂ i 95% d'humitat relativa.

A les 12h, es comprova que les AF-oMSCs es troben distribuïdes uniformement per tot el volum del constructe i ja han modificat la seva morfologia inicialment arrodonida, adoptant-ne una de més fibroblàstica. S'observen prolongacions citoplasmàtiques que comuniquen les AF-oMSCs entre si i que es mantenen després de 4 dies en cultiu (Figura 7.2. fletxes grogues). Les partícules de DBM es mostren com a estructures sòlides i amb autofluorescència en el canal blau (Figura 7.2. fletxes blanques).

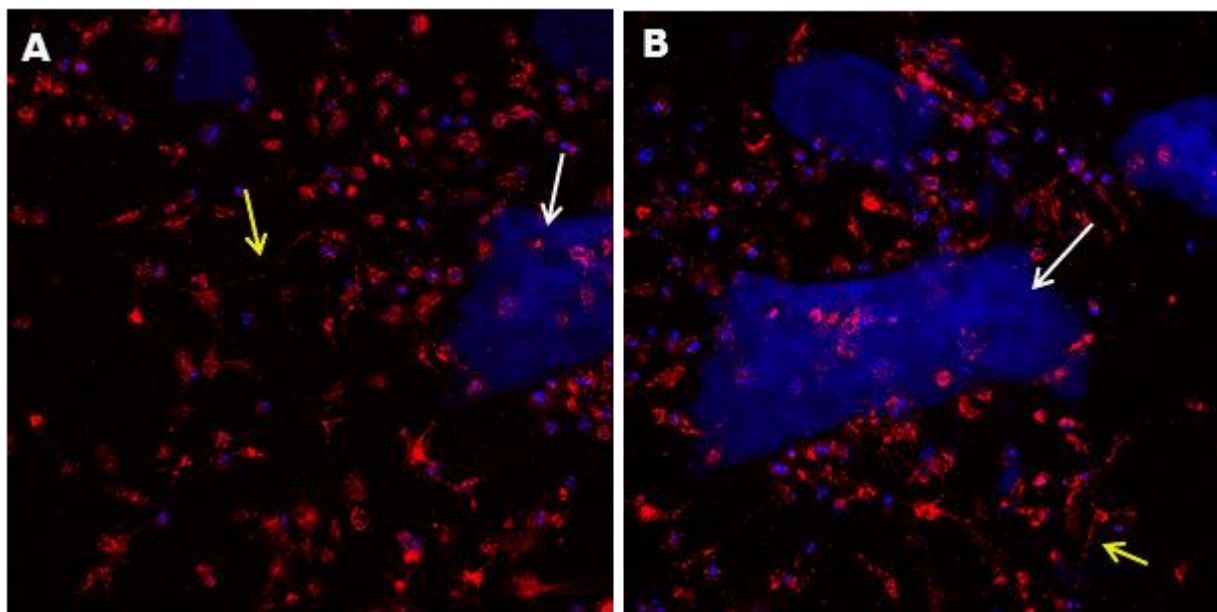


Figura 7.2. Observació de les AF-oMSCs de l'ovella 310 en el constructe de DBM i Fibrina a les 12h de la preparació (A) i després de 4 dies (B) (20X). En vermell (PKH26) es tenyeix el citoplasma cel·lular i en blau (Vybrant® Violet DyeCycle™) el nucli cel·lular. Les partícules de DBM adopten també coloració blava (autofluorescència) i s'indiquen en les imatges amb fletxes blanques.

7.2.3. TRIPLE REPARACIÓ DEL MMC AMB CONSTRUCTES DE DBM, FIBRINA I AF-oMSCs

A partir de l'experiència acumulada en els capítols anteriors, es decideix fer una primera sèrie de tres animals en els quals es s'avaluarà aquest tipus de constructes, però amb una peculiaritat: cadascuna de les vèrtebres d'un mateix animal es tractarà com a un grup experimental. Així doncs, es defineixen els següent tres grups experimentals:

- Grup 1: Vèrtebra A, DBM + Fibrina
- Grup 2: Vèrtebra B, DBM + Fibrina + $1,00 \times 10^6$ AF-oMSCs (dosi inferior)
- Grup 3: Vèrtebra C, DBM + Fibrina + $4,00 \times 10^6$ AF-oMSCs (dosi superior)

D'aquesta manera també s'avalua si la quantitat administrada d'AF-oMSCs té algun efecte en el grau de reparació del MMC, testant dues dosis cel·lulars que corresponen al rang menor i major amb els que hem treballat fins al moment.

7.2.3.1. Inducció quirúrgica del MMC

Es fa la cirurgia d'inducció de les 3 ovelles (97961, 3639 i 87848) entre el dia 74 i 76 de gestació sense incidències destacables i es recullen 93 (85-98) mL d'AF segons es descriu en l'apartat 9.1. *Cirurgia d'Inducció del Mielomeningocele.*

7.2.3.2. Aïllament i expansió de les AF-oMSCs i fabricació dels constructes

Entre 3 i 8 hores després de la recollida del AF, es sembren 80 mL d'AF i es cultiven durant un temps màxim de 21 dies. Al finalitzar l'etapa d'expansió les AF-oMSCs es tripsinitzen i es recompten les AF-oMSCs obtingudes:

Ovella	Temps cultiu (dia)	AF-oMSCs vives P0	Viabilitat (%)
3639	16	5,38 x10 ⁶	97
87961	16	2,72x10 ⁶	98
87848	21	7,00 x10 ⁶	98

Taula 7.1. AF-oMSCs vives i percentatge de viabilitat després de les etapes d'aïllament i expansió.

En el cultiu de l'AF 87961 que té una durada total de 16 dies s'obtenen només 2,72x10⁶ AF-oMSCs vives. En conseqüència, en aquest cas, el constructe amb dosi superior es fabrica contenint 1,70x10⁶ enlloc de 4,00x10⁶ AF-oMSCs vives.

Cadascuna de les suspensions d'AF-oMSCs es fracciona en els volums corresponents a les dosis cel·lulars desitjades i es procedeix a la preparació dels constructes. La quantitat de DBM afegida a cada constructe es mostra en la següent taula:

Ovella	Vèrtebra	Dosi Cel·lular (AF-oMSCs vives)	DBM (mg)
3639	A	N.A.	130,4
	B	1,00 x10 ⁶	126,8
	C	4,00 x10 ⁶	73,6
87961	A	N.A.	86,4
	B	1,00 x10 ⁶	96,9
	C	1,70 x10 ⁶	95,9
87848	A	N.A.	105,2
	B	1,00 x10 ⁶	112,5
	C	4,00 x10 ⁶	87,8

Taula 7.2. Dosi d'AF-oMSCs i quantitat de DBM (mg) continguda en els constructes fabricats per tractar els fetus amb MMC 87961, 3639 i 87848.

7.2.3.3. Reparació del mmc amb biomatrius de DBM, fibrina i AF-oMSCs

La reparació del MMC dels tres fetus ovins es porta a terme entre el dia 91 i 95 de gestació i el defecte en aquest grup d'animals està ben establert. Tal com s'ha avançat anteriorment, a partir del constructe de DBM, fibrina i AF-oMSCs es generen tres làmines que es disposen en la posició on hauria d'existir l'arc vertebral posterior (Figura 7.3.A).

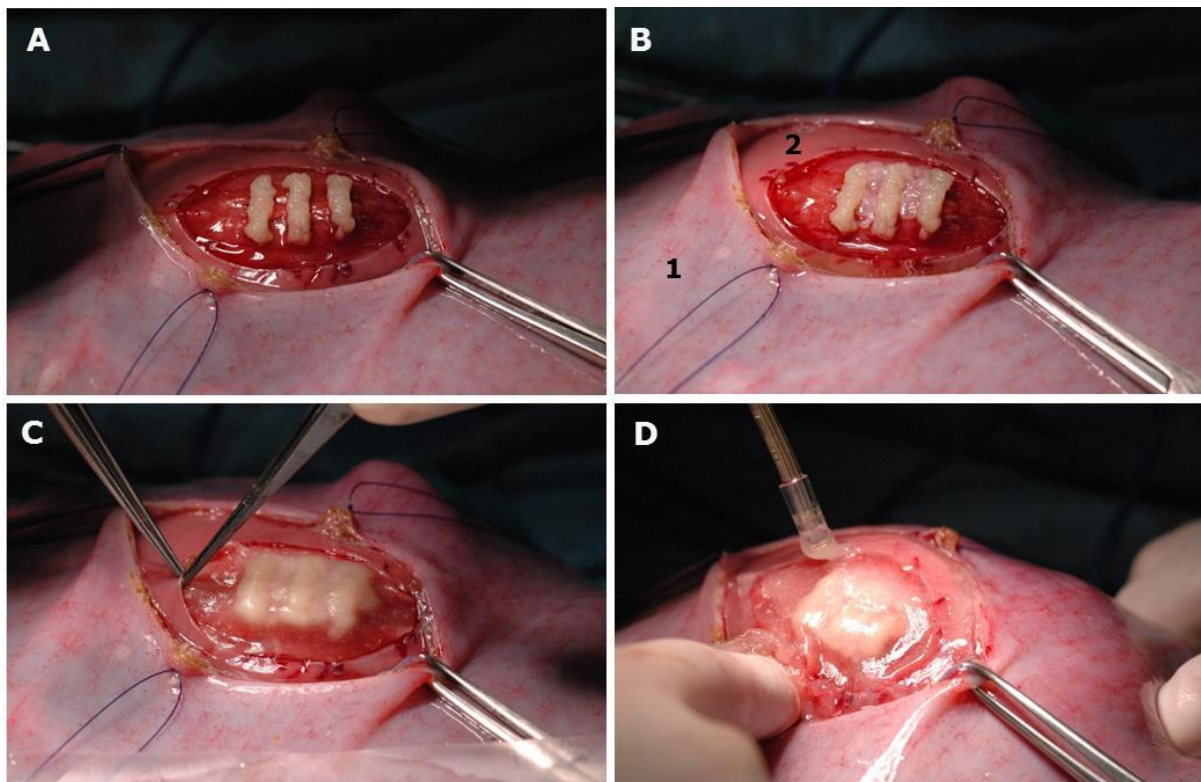


Figura 7.3. Reparació del MMC amb biomatrius de DBM, Fibrina i AF-oMSCs: Disposició de tres làmines longitudinals de DBM sobre el defecte seguint els monyons ossis (A) i, entremig, es col·loquen làmines de fibrina (B); es cobreix amb el substitut de pell Matriderm® (C) de manera que els implants quedin enterrat perifèricament per la pell i finalment es segella amb COSEAL® (D); 1) Paret uterina i 2) Part posterior del fetus oví.

Per omplir els espais que queden entremig, es col·loquen làmines de fibrina (Figura 7.3.B). A continuació, es procedeix amb la cobertura amb el substitut de pell Matriderm® i, finalment, segellant amb el COSEAL® (Figura 7.3.C i D). La cirurgia de reparació es porta a terme amb normalitat en els tres animals.

7.2.3.4. Avaluació dels fetus ovins tractats

Dos dels tres animals evolucionen fins al final de la gestació. L'ovella 3639 avorta als 13 dies de la reparació i, els altres dos, 87848 i 87961, arriben a terme amb 47 (144 dies de gestació) i 53 dies d'evolució des de la reparació (145 dies de gestació), respectivament.

L'aspecte macroscòpic de la zona del MMC en aquests dos últims casos és molt encoratjador. La lesió està completament reparada en el nounat 87961 i s'observa teixit seuós calcificat en la part més distal (Figura 7.4.A, fletxa vermella). En el nounat 87848, la zona del defecte també té molt bon aspecte, el MMC està reparat i, tot i que té una petita zona de pell que no està completament epitelitzada, no s'observa pèrdua de líquid cefaloraquídi (Figura 7.4.B, fletxa negra).

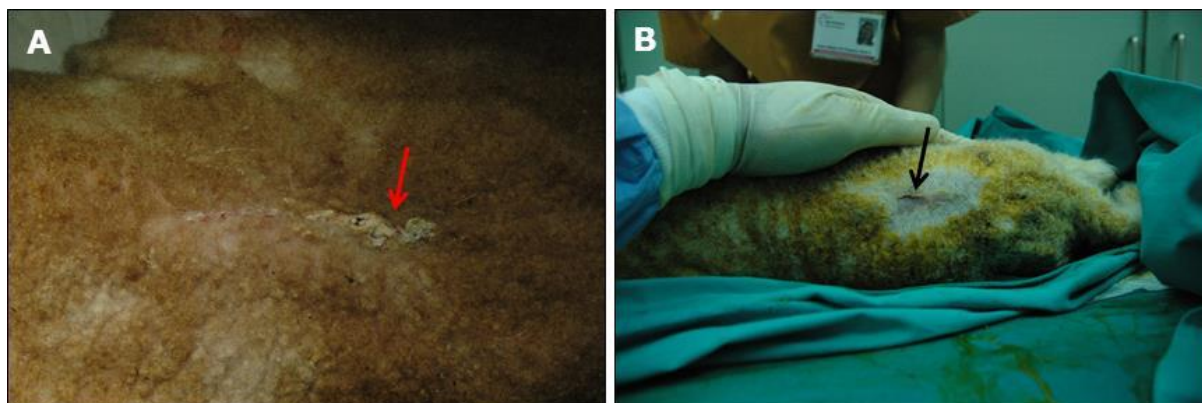


Figura 7.4. Aspecte macroscòpic del MMC de les ovelles reparades amb DBM, Fibrina i AF-oMSCs i nascudes a terme. A) 87961 i B) 87848. La fletxa vermella indica la presència de teixit calcificat i la fletxa negra una petita zona del defecte que no ha quedat completament coberta de pell.

A) Avaluació neurològica, sensitiva i motora dels nounats ovins:

Després de la reanimació dels animals, s'avalua el seu estat neurològic. El nounat 87961 al néixer no presenta trastorns de deglució ni atàxia. Els reflexes rotulians, aquil·lians i de retirada són correctes. Té la capacitat de posar-se dempeus i caminar uns passos. Tot i que el reflex anal sembla correcte, té incontinència urinària i possiblement també fecal. L'electromiografia d'aquest animal diu que la velocitat de conducció i els potencials evocats són normals i equivalents als del germà sa que ha nascut amb ell.

El nounat 87848 no presenta atàxia ni disfàgia. Mobilitza les quatre extremitats, i el reflexes rotulians, aquil·lians i de retirada són correctes, malgrat no presenta capacitat de posar-se dempeus o caminar. El reflex hi és present i no sembla tenir incontinència urinària. A més, l'anàlisi electromiogràfic mostra que els potencials evocats i també la velocitat de conducció ciàtica són normals.

B) Avaluació histològica dels animals tractats

L'anàlisi dels teixits formats en la zona de reparació del MMC utilitzant constructes de DBM, fibrina i AF-oMSCs ens aporta dades molt interessants, que es presenten a continuació.

En primer lloc destacar que, tot i que no es genera teixit cartilaginós ni muscular, sí que observem la formació de teixit ossi i, a més, la localització correspon a la posició on s'ha ubicat el constructe durant la reparació del MMC. Aquesta troballa es dona només en aquelles vèrtebres reparades amb constructes que contenen AF-oMSCs (Taula 7.3.).

Per tal de poder quantificar el teixit ossi neofomat, i tal com es detalla en l'apartat 9.16.3. del capítol de *Materials i Mètodes*, es defineix una escala de puntuació del 0 al 5 (0) No presència de DBM; 1) Presència de DBM sense colonitzar; 2) Colonització de poques espícules de DBM; 3) Colonització de moltes espícules de DBM; 4) Formació d'arc vertebral parcial; 5) Formació d'arc vertebral complet).

La vèrtebra control de l'ovella 87961 es puntua amb un 0 perquè no presenta restes de DBM en la zona de reparació i les vèrtebres control de les ovelles 3639 i 87848 amb un 1, ja que s'observa el DBM però sense colonitzar.

En canvi, en les vèrtebres reparades amb AF-oMSCs es produeix la neoformació d'os de tipus osteocondral i per aposició de matriu sobre les partícules de DBM (Figura 7.5.).

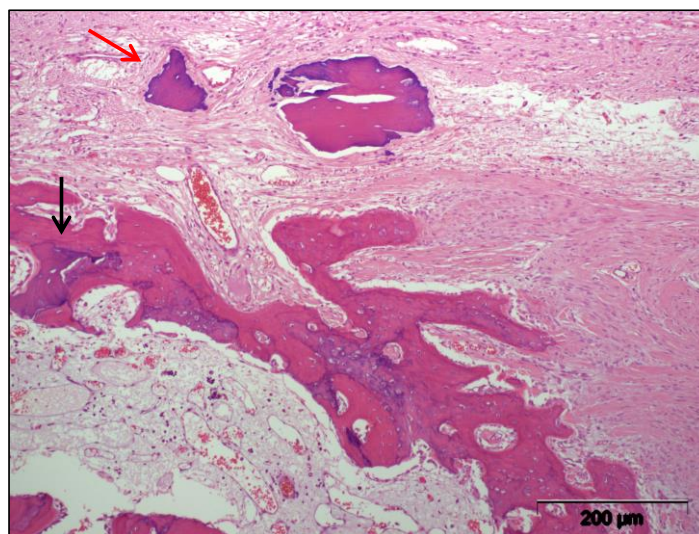


Figura 7.5. Tinció HE de la zona reparada del nounat 87961. S'observa la presència de partícules de DBM originals (fletxa vermella) i la generació de teixit ossi *de novo* per aposició de matriu sobre les partícules de DBM (fletxa negra).

Ovella	Grup experimental	Evolució (dies)	Medul·la espinal	Presència de cartílag	Presència d'os	Presència de múscul	Presència de teixit fibrós	Presència de teixit adipós	Presència de pell	Hemorràgia	Congestió
3639	A	13	Conservada	NO	1	NO	Teixit mesenquimal desorganitzat immadur	NO	NO	NO	SÍ
	B		Aixafada	NO	1	NO		NO	SÍ (Hiperqueratòsica)	SÍ	SÍ
	C		Aixafada	NO	1	NO		NO	SÍ (Ulcerada)	SÍ	SÍ
87961	A	53	Conservada	NO	0	NO	SÍ	SÍ	SÍ	NO	NO
	B		Conservada /DBM impactant	NO	5	NO	SÍ	NO	SÍ (Hiperqueratòsica)	NO	NO
	C		Conservada /DBM impactant	NO	4	NO	SÍ	NO	SÍ (Hiperqueratòsica)	SÍ (Lateral)	NO
87848	A	48	DBM impactant	NO	1	NO	SÍ	SÍ	SÍ (Hiperqueratòsica)	SÍ (subcutània)	SÍ
	B		DBM impactant	NO	1	NO	SÍ	SÍ	SÍ (Hiperqueratòsica)	SÍ (subcutània)	SÍ
	C		Conservada	NO	4	NO	SÍ (Ossificació sobre la banda de teixit fibrós)	SÍ	SÍ (Hiperqueratòsica)	SÍ	NO

Taula 7.3. Avaluació histològica de la zona del MMC reparada amb DBM, fibrina i AF-oMSCs (si aplica). Per a cadascuna de les ovelles, s'identifica el grup experimental al que pertanyen, els dies des de la reparació fins a l'obtenció del nounat oví i s'avalua l'estat de la medul·la espinal, la presència de pell, múscul, cartílag, os, teixit fibrós, teixit adipós, congestió i hemorràgia. La formació d'os es quantifica amb la següent escala: 0) No presència de DBM; 1) Presència de DBM sense colonitzar; 2) Colonització de poques espícules de DBM; 3) Colonització de moltes espícules de DBM; 4) Formació d'arc vertebral parcial; 5) Formació d'arc vertebral complet.

En el nounat 87961 (vèrtebra B) fins i tot s'ha format un arc vertebral complet amb el que sembla moll d'os a l'interior (Figura 7.6.). Per sobre del teixit ossi, hi ha una banda de teixit fibrós organitzat i la pell regenerada.

En l'ovella 87848 la neoformació del teixit ossi no és tan prominent. Tot i així, és important destacar que hi ha ossificació en forma d'arc vertebral incomplet i aquesta es dóna sobre la banda fibrosa.

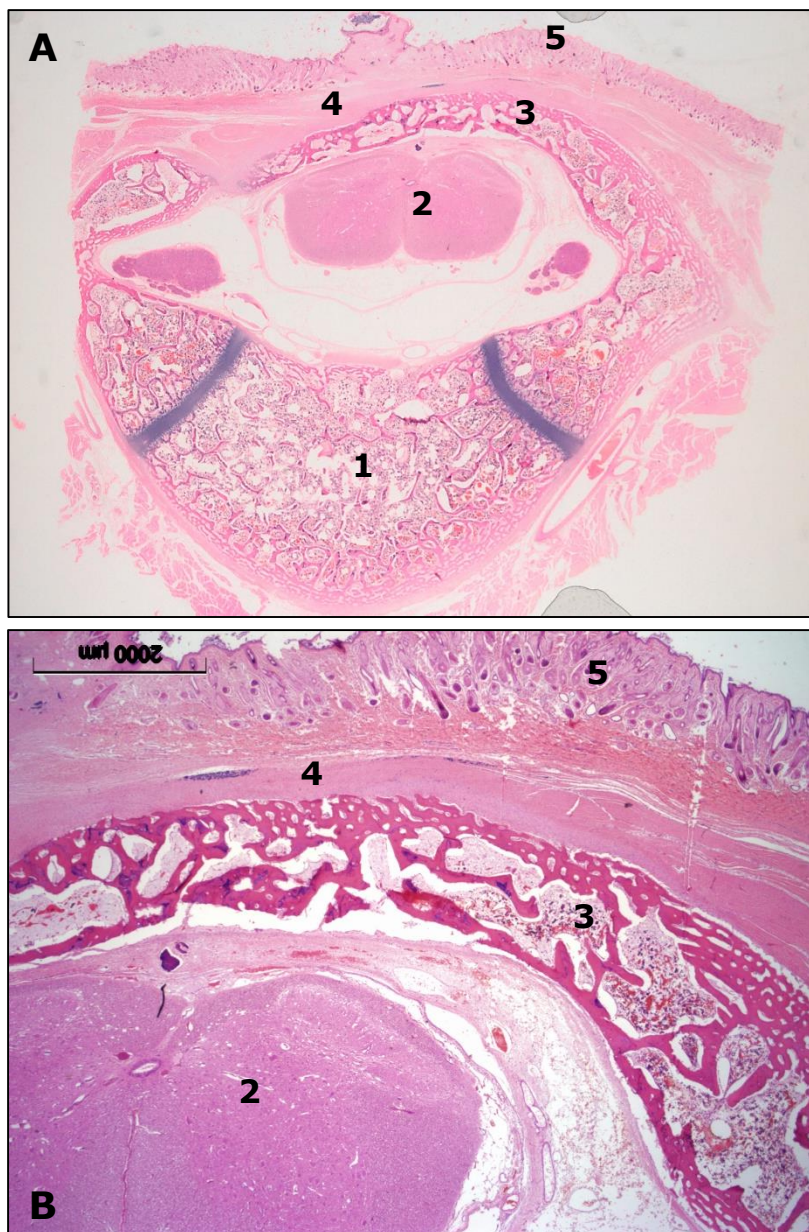


Figura 7.6. Tinció HE de la vèrtebra B del nounat 87961: A) Visió general (1X) i B) Visió ampliada (4X); 1) Cos vertebral, 2) Medul·la espinal, 3) Arc vertebral posterior, 4) Teixit connectiu organitzat i 5) Pell.

Per altra banda, també cal remarcar que per primera vegada apareix teixit adipós a la zona de reparació, sobretot localitzada a les zones laterals (Figura 7.7.).

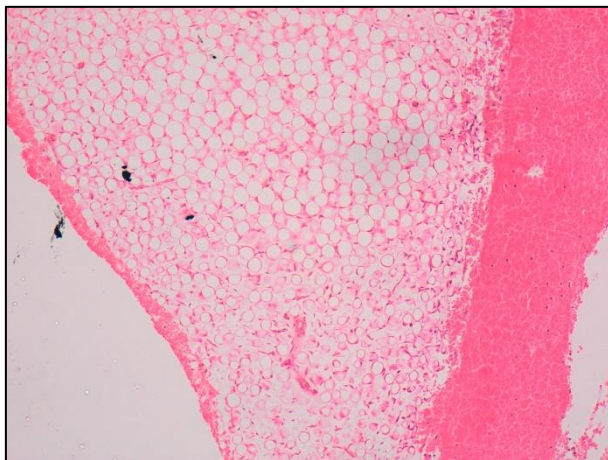


Figura 7.7. Tinció HE on es mostra el teixit adipós generat en la zona de reparació del MMC (10X).

Pel que fa a la medul·la, desafortunadament en la majoria dels casos no es troba conservada i hi ha partícules de DBM impactant en el teixit neural.

7.2.4. REPARACIÓ DEL MMC AMB CONSTRUCTES DE DBM, FIBRINA I AF-oMSCs

A partir dels resultats positius de l'apartat anterior, s'inicia una nova sèrie experimental amb un total de 16 ovelles gestants. Com que s'ha observat la regeneració de l'os fins i tot administrant la dosi inferior d'AF-oMSCs, és per aquest motiu que la dosi clínica es manté entre $2,0-4,0 \times 10^6$ AF-oMSCs. Addicionalment, s'introdueix un nou grup experimental amb les AF-oMSCs marcades amb eGFP per tal de fer-ne el seguiment en la zona de reparació. Per tant, els animals en els tres grups experimentals es reparteixen de la següent forma:

- Grup 1: DBM + Fibrina (control), 4 animals
- Grup 2: DBM + Fibrina + AF-oMSCs, 7 animals
- Grup 3: DBM + Fibrina + AF-oMSCs marcades amb eGFP, 5 animals

7.2.4.1. Inducció quirúrgica del MMC

La inducció quirúrgica del MMC es fa als 76 (67-89) dies de gestació sense incidències destacables. Es recullen aproximadament 100 mL d'AF de cadascuna de les ovelles dels cultius dels grups experimentals 2 (DBM + Fibrina + AF-oMSCs) i 3 (DBM + Fibrina + AF-oMSCs marcades amb eGFP).

7.2.4.2. Aïllament, expansió i marcatge de AF-oMSCs del líquid amniòtic

En els cultius corresponents al grup experimental 2, s'obtenen després de 17 (15-20) dies de cultiu una mediana de $4,03 \times 10^6$ ($2,38 \times 10^6$ - $1,58 \times 10^7$) AF-oMSCs vives amb una viabilitat igual o superior al 94%. Aquestes cèl·lules es destinen directament a la fabricació del constructe.

En el grup 3, en canvi, un cop les AF-oMSCs han estat aïllades, es tripsinitzen i ressemblen en nous flascons de cultiu. A dia 4 i dia 5 d'aquest passi, es transdueixen amb sobrenedant viral VSV-G/eGFP seguint el protocol descrit a l'*apartat 9.10. de Materials i Mètodes* amb l'objectiu de fer-ne el seguiment *ex vivo*. L'endemà, les AF-oMSCs es comprova l'expressió de eGFP mitjançant microscòpia de fluorescència (Figura 7.8.) i es determina l'eficiència de transducció obtinguda que oscil·la entre el 31,6 i el 68,9%.

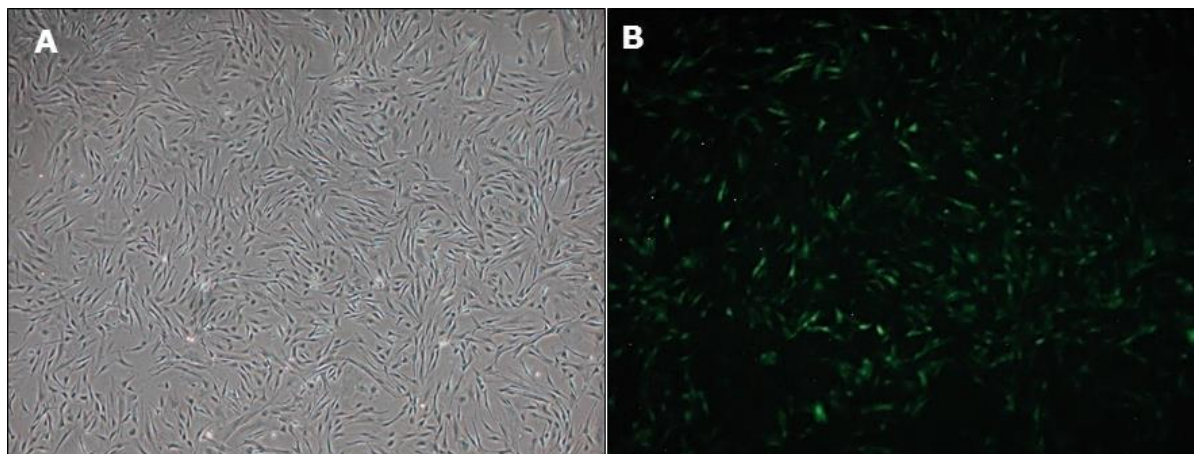


Figura 7.8. Observació microscòpica d'AF-oMSCs transduïdes amb el vectors virals VSV-G/eGFP en imatge de camp clar (A) i amb fluorescència (B) (4X).

A continuació, les AF-oMSCs transduïdes es ressemblen de nou per dur a terme l'etapa d'expansió final que dura 5 (4-6) dies i així poder assolir la dosi clínica. Al final d'aquesta fase, s'obtenen $4,73 \times 10^6$ ($3,68 \times 10^6$ - $5,38 \times 10^7$) al 97,4 (92,0-98,2)% de viabilitat i amb una taxa d'expressió de eGFP del 85,2 (73,1-93,6)%.

En la següent taula es mostren els valors relatius a la dosi administrada d'AF-oMSCs, dosi AF-oMSCs marcades amb eGFP i quantitat de DBM dels constructes manufacturats per cadascuna de les ovelles:

Ovella	Grup Experimental	Dosi AF-oMSCs vives	AF-oMSCs eGFP positives	DBM (mg)		
718				186,7		
87812	DBM + Fibrina (control)	N.A.	N.A.	148,9		
87884				174,4		
76335				143,9		
712				2,59x10 ⁶	183,8	
22066		4,24x10 ⁶		149,1		
20960		2,03x10 ⁶		135,5		
20975	DBM + Fibrina + AF-oMSCs	3,42x10 ⁶	N.A.	176,4		
87787				4,00 x10 ⁶	160,4	
75				6,15 x10 ⁶	188,4	
13336				2,32 x10 ⁶	147,2	
32523				4,68 x10 ⁶	4,38 x10 ⁶	137,2
12698	DBM + Fibrina + AF-oMSCs marcades amb eGFP	5,10x10 ⁶	4,34 x10 ⁶	160,3		
151				4,50 x10 ⁶	3,72 x10 ⁶	149,4
12839				3,98 x10 ⁶	2,90 x10 ⁶	159,2
87944				3,15 x10 ⁶	2,74 x10 ⁶	165,2

Taula 7.4. Dosi d'AF-oMSCs, dosi d'AF-oMSCs marcades amb eGFP i quantitat de DBM dels constructes manufacturats per la reparació del MMC; N.A.: No aplica.

7.2.4.3. Reparació del MMC amb biomatrius de DBM, Fibrina i AF-oMSCs i evolució dels animals tractats

En primer lloc, destacar que tots els animals sotmesos a la cirurgia d'inducció continuen vius en el moment de la reparació i, únicament en dos animals (151 i 22066) s'observa un tancament parcial espontani del MMC. Per tant, el número d'animals destinats a cada grup experimental es manté en:

- Grup 1: DBM + Fibrina (control), 4 animals
- Grup 2: DBM + Fibrina + AF-oMSCs, 7 animals
- Grup 3: DBM + Fibrina + AF-oMSCs marcades amb eGFP, 5 animals

Després de la reparació si que es produeix l'avortament d'11 dels 16 fetus tractats (Figura 7.9.) i arriben a terme 2 animals del grup control (DBM + Fibrina), 2 tractats amb DBM, Fibrina i AF-oMSCs i 1 amb DBM, Fibrina i AF-oMSCs marcades. Per tant, la taxa de supervivència associada als constructes de DBM és del 31.2%.

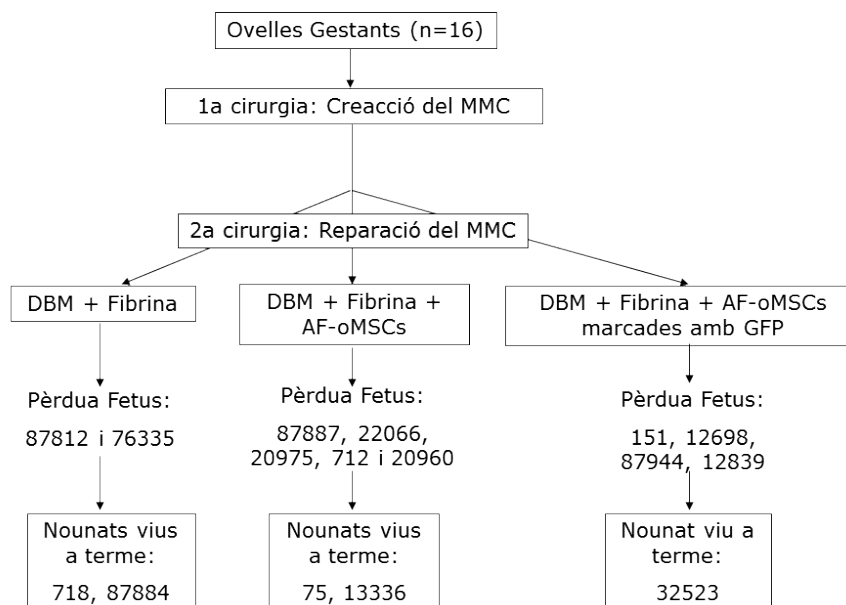


Figura 7.9. Distribució de les ovelles en el diferents grups experimentals al final de la gestació.

Els dies d'evolució del fetus des de la reparació fins al naixement dels animals que arriben a terme es mostren en la següent taula:

OVELLA	GRUP EXPERIMENTAL	TEMPS EVOLUCIÓ (dia)
718	DBM + Fibrina	25
87884	DBM + Fibrina	56
75	DBM + Fibrina + AF-oMSCs	50
13336	DBM + Fibrina + AF-oMSCs	49
32523	DBM + Fibrina + AF-oMSCs marcades	40

Taula 7.5. Temps des de la reparació fins a la obtenció del nounat viu dels animals reparats amb DBM, fibrina i AF-oMSCs.

7.2.4.4. Avaluació dels fetus ovins tractats

A) Avaluació neurològica, sensitiva i motora dels nounats ovins

Del grup control (DBM i fibrina), l'ovella 718 neix prematurament als 117 dies de gestació i, tot i que està evolucionada, no sobreviu a la reanimació per la qual cosa no es pot valorar.

L'ovella 87884, també del grup control, presenta el defecte tancat. No presenta atàxia, trastorns en la deglució ni hidrocefàlia aparent. Mostra parapèsia de les extremitats inferiors, amb pèrdua de propiocepció de les potes posteriors. Té manca de reflexes osteotendinosos profunds, però sí reflexes de retirada correctes. Finalment, té incontinència urinària aparent.

L'ovella 75, que ha estat tractada amb DBM, fibrina i AF-oMSCs (grup experiment 2) presenta un estat sensitiu, motor i neurològic aparentment normal. Es manté dempeus i camina sense problemes, i els reflexes osteotendinosos són correctes. A més a més, no té atàxia, incontinència urinària ni trastorns en la deglució.

L'ovella 13336 (grup experimental 2) tampoc presenta trastorns en la deglució ni hidrocefàlia aparent. Els reflexes de retirada i els reflexes osteotendinosos profunds també són correctes. Es manté dempeus sense ajuda, però no té capacitat per caminar. En aquest cas, però, sí s'observa atàxia a les extremitats superiors, incontinència urinària i el reflex anal és dubtós.

Finalment, l'ovella 32523 tractada amb DBM, fibrina i AF-oMSCs marcades, neix prematurament (138 dies gestació). El defecte està tancat encara que li manca epitelització. No presenta atàxia, ni hidrocefàlia i tampoc trastorns en la deglució. Pel contrari, sí mostra incontinència urinària i anal. Els reflexes són correctes i es manté dret tot i que no camina.

B) Avaluació histològica dels animals tractats

L'anatomia patològica de la zona de reparació s'ha analitzat en els animals arribats a terme vius i també en tots aquells fetus avortats que s'han pogut recuperar i processar (Taula 7.6.).

En els animals del grup control, o no s'observa la presència d'espícules de DBM o bé hi són presents acompanyades per osteoclasts (Figura 7.10.). A la zona de reparació trobem també teixit connectiu, teixit adipós i, únicament en l'animal que ha evolucionat més temps (87884), la pell està regenerada.

En els animals reparats amb AF-oMSCs sense marcar i que han evolucionat menys de 15 dies (22066, 20960 i 20975), observem que les espícules de DBM tenen una posició més aviat lateral i el Matriderm® persisteix (Figura 7.11.).

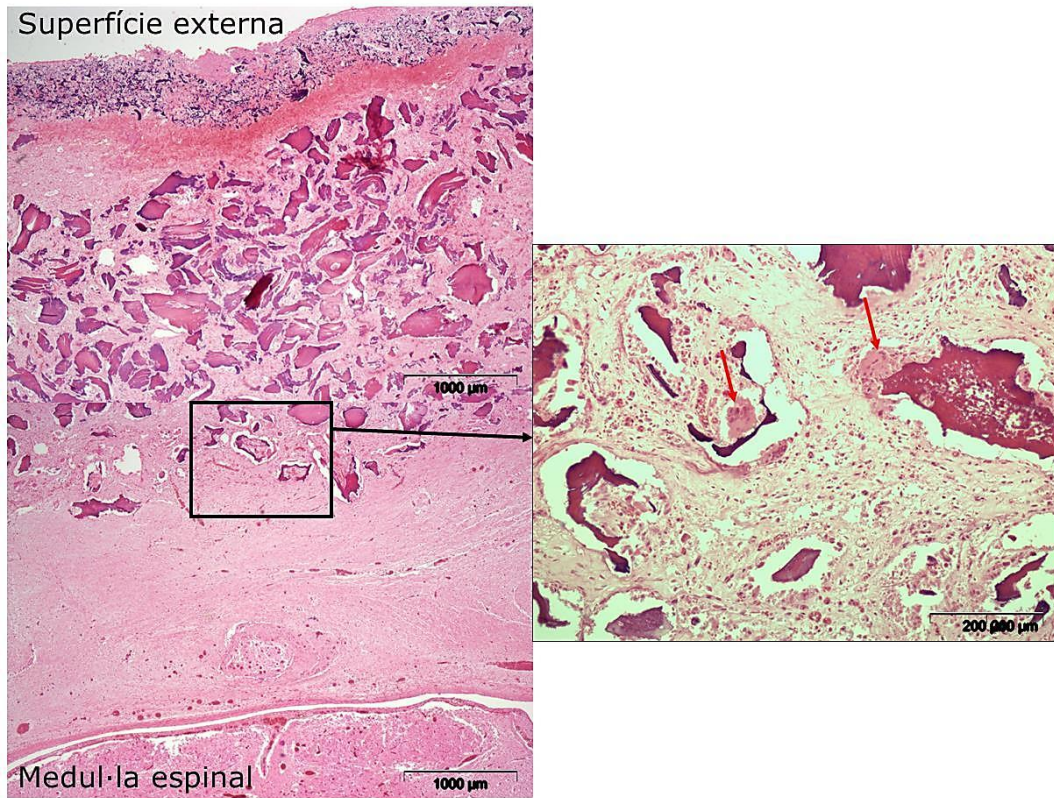


Figura 7.10. Tinció HE de la vèrtebra tractada fetus oví 718 en el que els osteoclasts (fletxes vermelles) estan reabsorbint les partícules de DBM.

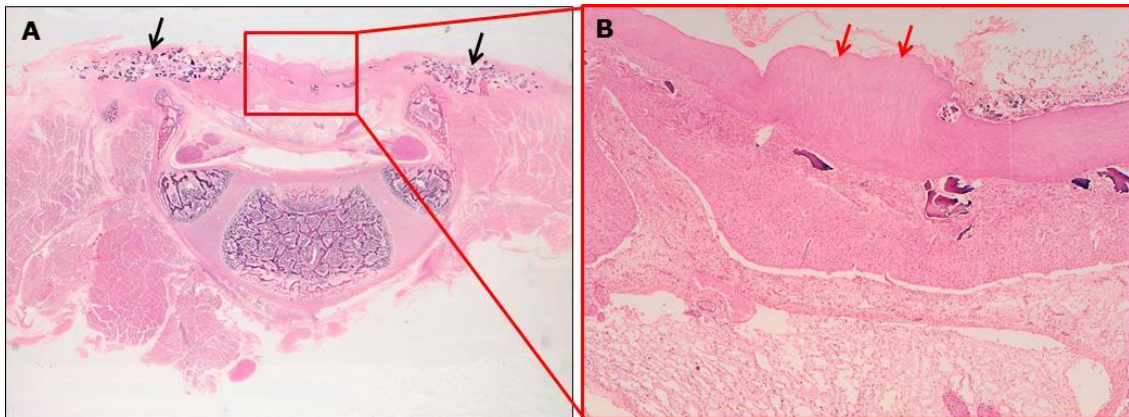


Figura 7.11. Tinció HE de la vèrtebra del fetus oví 20960 on s'observa la medul·la espinal aixafada, la posició majoritàriament lateral de les partícules de DBM (fletxes negres) i el Matrigel® a la zona central (fletxa vermella); A) 1X i B) 4X.

Ovella	Grup experimental	Evolució (dies)	Medul·la espinal	Presència d'os	Presència de múscul	Presència de teixit fibrós	Presència de teixit adipós	Presència de pell	Altres a destacar
718	DBM + Fibrina (control)	25	Conservada	1 (Osteoclastes)	NO	Sí	SÍ	NO	Hemorràgia i congestió en relació al DBM
87812		9	Aixafada i exterioritzada	0	NO	NO	NO	NO	N.A.
87884		56	Desestructurada i adherida	0	NO	SÍ	SÍ	SÍ (Ulcerada en punt mig, la resta regenerada)	Hemorràgia
712	DBM + Fibrina + AF-oMSCs	18	Desestructurada amb DBM impactant	4	NO	SÍ	SÍ	SÍ	Congestió perimedul·lar
22066		10	Desestructurada amb DBM impactant	1	NO	SÍ	NO	NO	N.A.
20960		14	Desestructurada amb DBM impactant	2	NO	SÍ (No complet)	NO	NO	N.A.
20975		8	Desestructurada i herniada	1	NO	SÍ (Lateral a la medul·la)	NO	SÍ (ulcerada)	N.A.
75		50	Conservada	1	NO	SÍ (Parcialment calcificat)	SÍ	SÍ	N.A.
13336		49	Conservada	2	NO	SÍ (Banda gruixuda col·lagen I positiva)	NO	SÍ	N.A.

Ovella	Grup experimental	Evolució (dies)	Medul·la espinal	Presència d'os	Presència de múscul	Presència de teixit fibrós	Presència de teixit adipós	Presència de pell	Altres a destacar
32523	DBM + Fibrina + AF-oMSCs marcades amb GFP	40	Aixafada	1	NO	SÍ	SÍ	NO	Congestió i hemorràgia
12698		11	Desestructurada amb DBM impactant	2	NO	SÍ	NO	NO	Inflamació aguda i colònies bacterianes
151		16	Desestructurada amb DBM impactant	2	NO	NO	SÍ	NO	Inflamació aguda i colònies bacterianes

Taula 7.6. Avaluació histològica de la zona del MMC reparada amb DBM, fibrina i AF-oMSCs (si aplica). Per a cadascuna de les ovelles, s'identifica el grup experimental al que pertanyen, els dies des de la reparació fins a l'obtenció del nounat oví i s'avalua l'estat de la medul·la espinal, la presència de pell, múscul, cartílag, os, teixit fibrós, teixit adipós, congestió i hemorràgia. La formació d'os es quantifica amb la següent escala: 0) No presència de DBM; 1) Presència de DBM sense colonitzar; 2) Colonització de poques espícules de DBM; 3) Colonització de moltes espícules de DBM; 4) Formació d'arc vertebral parcial; 5) Formació d'arc vertebral complet.

En 3 dels 6 animals del grup experimental 2 (DBM + Fibrina + AF-oMSCs) trobem partícules de DBM colonitzades en diferent grau, i un d'ells formant un arc vertebral parcial (Figura 7.12.).

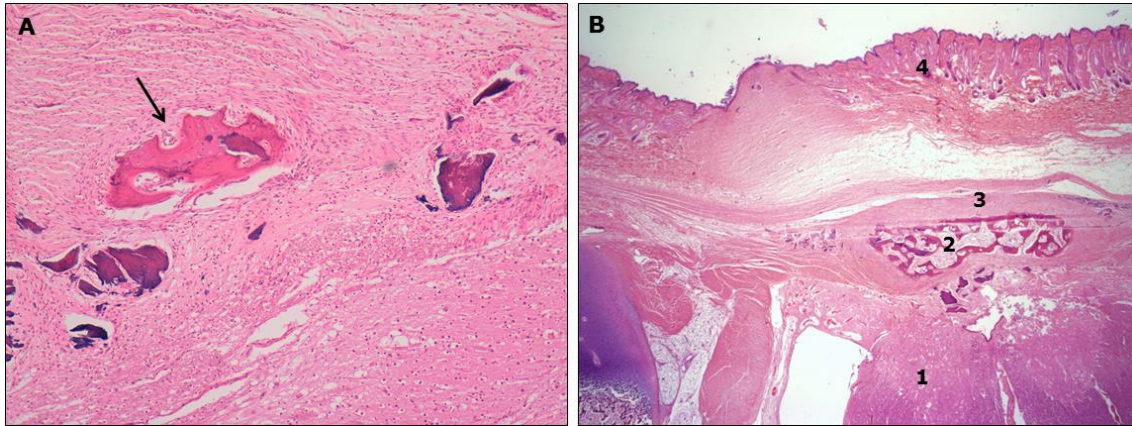


Figura 7.12. Tinció HE de: A) Zona d'interès de la vèrtebra 13336 on s'aprecia l'inici de la síntesi de matriu òssia (fletxa negra) (10X); B) Vèrtebra del fetus oví 712 on s'observa la formació d'una banda de teixit òssi (2) envoltada per una banda fibrosa (3) entre la medul·la espinal (1) i la pell (4) (4X).

A més a més, resulta interessant la detecció de dos fenòmens que no s'han donat anteriorment. En l'animal 75 es forma una banda de teixit fibrós dens ric en fibres elàstiques i parcialment calcificada formant un arc des dels monyons ossis. Per confirmar la calcificació, es fa una tinció Von Kossa a un dels talls histològics sent el resultat no conclouent, ja que el cos vertebral (control positiu intern) no es tenyeix.

En l'animal 13336, les partícules de DBM es veuen colonitzades i es troben enmig d'una banda de teixit fibrós positiva per col·lagen I, indicatiu de la síntesi de nova matriu òssia (Figura 7.13.).

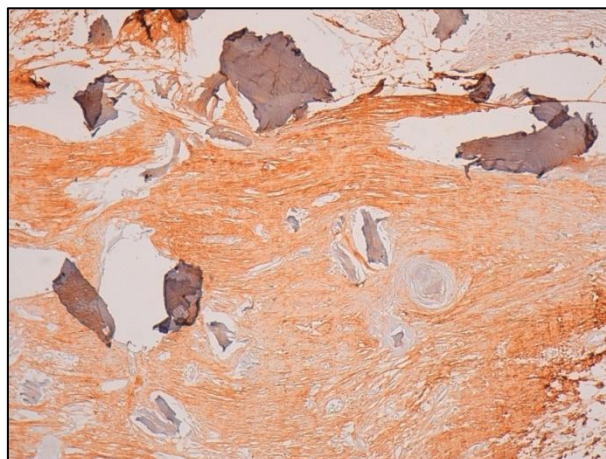


Figura 7.13. Banda fibrosa positiva pel col·lagen I envoltant les partícules de DBM en el nounat 13336 (10X).

En la resta d'animals, per sobre la medul·la es troba teixit fibrós organitzat positiu per col·lagen III, barrejat amb les partícules de DBM i zones amb teixit adipós.

Respecte a la medul·la espinal, únicament en aquests dos últims animals la medul·la es troba conservada. En la resta, la medul·la està aixafada i s'hi troben partícules de DBM impactades.

Per últim, la cobertura cutània es troba completament regenerada en quatre del sis animals, i de nou concorda amb un major temps d'evolució.

Del grup d'animals reparat amb AF-oMSCs marcades amb eGFP comentar que els resultats són equivalents al grup anterior. Observem partícules de DBM colonitzades en dos dels tres animals processats. La medul·la espinal es troba desestructurada i amb partícules de DBM impactades. No s'observa teixit muscular, i en canvi, sí teixit connectiu organitzat i teixit adipós. En aquest grup, cap dels tres animals presenta la pell regenerada.

Finalment, es fa la tinció immunohistoquímica de la eGFP en els talls histològics de les vèrtebres tractades amb AF-oMSCs marcades. Els fetus ovins 151 i 12698 presenten inflamació aguda i colònies bacterianes en la zona d'interès. La presència de bacteris distorsiona la detecció, ja que, es tenyeixen inespecíficament. Tenint en compte aquest fet, les seves preparacions es consideren no valorables. Pel contrari, sí que es detecten AF-oMSCs positives per la eGFP en la zona de reparació del nounat a 32523, sobretot localitzades en la zona propera a la cicatriu cutània (Figura 7.14.).

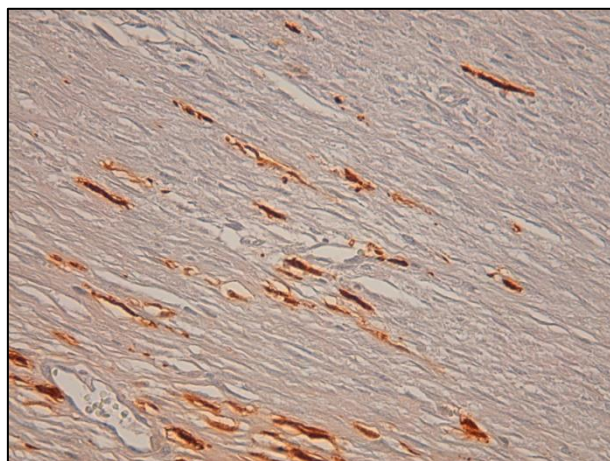


Figura 7.14. Detecció d'AF-oMSCs marcades amb eGFP mitjançant tècniques d'immunohistoquímica en la zona de reparació del MMC del nounat 32523. Les AF-oMSCs positives adopten coloració marronosa (20X).

7.3. DISCUSSIÓ DE RESULTATS I CONCLUSIONS

En aquest capítol, s'ha estudiat la reparació del MMC mitjançant l'aplicació de biomatrius compostes per una barreja de DBM, fibrina i AF-oMSCs.

Els resultats obtinguts evidencien la possibilitat de generar una estructura òssia que recorda l'arc vertebral posterior, amb moll d'os a l'interior i que tanca el defecte del MMC anatòmicament d'una forma natural.

El grau de regeneració del teixit ossi obtingut és variable en funció de l'animal avaluat. De forma general, els animals que han evolucionat pocs dies després de la reparació solen mostrar poques partícules òssies colonitzades mentre que els nounats que presenten un arc vertebral parcial o complet solen ser aquells que han evolucionat fins al final de la gestació i han arribat a terme vius.

D'altra banda, també s'observen fenòmens en la zona de reparació que, tot i no haver donat lloc a teixit ossi com a tal, semblen aportar una avantatge respecte les biomatrius avaluades anteriorment, com són l'activació de la síntesi de col·lagen I o la formació d'una banda fibrosa parcialment calcificada. Aquí és important apuntar que no s'ha pogut verificar la calcificació de la banda mitjançant una tinció von Kossa. Aquest fet possiblement pugui estar relacionat amb el tractament amb descalcificant que es fa a totes les vèrtebres, prèvia inclusió amb parafina per dur a terme els estudi histològics i immunohistoquímics.

Per contra, l'anatomia de la zona reparada en els animals control (DBM i fibrina sense AF-oMSCs) és similar a l'obtinguda utilitzant només coàguls de fibrina. És a dir, la formació de teixit connectiu organitzat, aquí amb restes de partícules de DBM, i la possibilitat de regenerar la pell. La detecció d'osteoclastes en aquesta zona porta a pensar que en absència d'AF-oMSCs, les partícules de DBM puguin ser reabsorbides.

Al voltant del teixit ossi pròpiament dit, o en el seu defecte, de les partícules de DBM, s'ha observat teixit connectiu organitzat, presència de nous vasos i també l'aparició per primera vegada de teixit adipós, que s'ha confirmat amb la tinció específica S100. Aquest fet, demostraria el possible efecte regenerador dels teixits d'origen mesenquimals per part constructe.

Malauradament, el fet d'administrar les partícules de DBM dins un coàgul de fibrina no ha evitat l'impacte d'algunes partícules sobre el teixit neural. No obstant això, l'avaluació motora i neurològica dels animals que han arribat a terme és favorable, ja que no només presenten bon estat general, sinó que fins i tot han mantingut la

funció sensitiva i motora, fins al punt que els nounats poden caminar uns passos. La possible millora de la lesió neurològica present en el moment de la reparació a causa del tractament aplicat no es pot descartar. De fet, un estudi publicat recentment ha demostrat la millora de la funció neurològica, així com la preservació de la densitat dels cordons de la medul·la espinal després de l'administració de MSCs humanes aïllades d'un altre teixit extraembrionari, en aquest cas, procedents de la placenta (156).

És important destacar que l'exploració neurològica dels animals és difícil per diferents motius. El primer és que són animals que han sofert dues cirurgies fetals, per la qual cosa normalment són més petits i més dèbils. A més, han estat obtinguts per cesària, procediment que requereix anestèsia i provoca que necessitin reanimació immediata, moltes vegades amb intubació i càrrega endovenosa de glucosa. En el moment del naixement se'ls dóna calostre oví obtingut de granja, però la seva capacitat de menjar també pot estar alterada. Així doncs, són animals debilitats que poden no mostrar bé la seva capacitat de posar-se drets o de caminar. En ocasions ni tan sols es recuperen després de la cesària i encara que l'animal tingui un bon aspecte, no s'aconsegueix que respirin espontàniament. Per fer l'exploració electromiogràfica cal que l'animal tingui 24 hores de vida i, això, moltes vegades no ha estat possible.

En consonància amb els capítols anteriors, la regeneració de la pell en els animals ha tingut lloc transcorregut un temps mínim des de la reparació, i que coincideix amb l'aparició de les estructures cutànies durant la gestació en les ovelles i que es produeix a partir de la tretzena setmana de gestació (157).

Finalment, hem sigut capaços de detectar *ex vivo* les AF-oMSCs marcades mitjançant la transducció amb partícules virals VSV-G que codifiquen per l'eGFP i que han sigut administrades posteriorment. Tot i que aquests resultats són preliminars, ja que s'ha donat en un sol animal, confirmarien la viabilitat del mètode de marcatge. De totes maneres, caldria acumular més experiència per tal de poder entendre el possible mecanisme de regeneració del teixit ossi a través de la identificació i localització de les AF-oMSCs en la zona de reparació.

En resum, els constructes preparats amb DBM, fibrina i AF-oMSCs aporten un avantatge significatiu respecte als altres tipus de biomatrius testades, ja que hem demostrat la possibilitat de regenerar l'arc vertebral posterior cobert per una capa de teixit connectiu organitzat, teixit adipós i pell en el fetus oví amb MMC.

Respecte a les limitacions de l'estudi, el model oví d'espina bífida fetal emprat en aquest treball és un model induït quirúrgicament. Tot i no ser un model congènit, els animals als quals es crea el defecte i han arriben a terme sense tractar, presenten alteracions anatòmiques i neurològiques similars a l'espina bífida natural.

A diferència de l'humà, l'ovella com a model animal no permet un control postoperatori immediat de la gestació, ja que és un animal gregari que ha de conviure amb altres ovelles i, per tant, no es pot immobilitzar, ni aïllar per monitoritzar la funció uterina i l'estat del fetus. Això comporta una alta taxa de part preterme i avortament.

Malgrat tot això, és segurament el millor model animal per fer cirurgia fetal de l'espina bífida per diverses raons: és un animal dòcil; la durada de la gestació permet dur a terme totes les fases experimentals; la mida de l'úter i del fetus és adequada per practicar la tècnica quirúrgica; el fet que tingui només un o dos fetus facilita l'abordatge uterí i, finalment, l'equip veterinari de cirurgia experimental amb què s'ha treballat és altament expert en aquest tipus d'animal gran.

7.4. TREBALL FUTUR

Aquest treball de tesi doctoral proporciona una important prova de concepte per a la demostració de l'eficàcia del constructe basat en DBM, fibrina i AF-oMSCs en el tractament prenatal del MMC. Tot i així, la preservació del teixit neuronal no és completa i es requereix un mètode d'administració menys invasiu que doni lloc a una major supervivència dels animals i, al seu torn, permeti una avaluació més completa d'aquests quan arribin a terme.

Pensant en la futura aplicació clínica del producte d'ET dissenyat en l'ésser humà, els següents estudis haurien d'anar dirigits a recol·lectar la informació necessària per completar les diverses fases del desenvolupament preclínic per un medicament de teràpia avançada. És a dir, completar la investigació relativa a l'eficàcia i seguretat del producte d'ET incloent estudis de biodistribució/persistència, tumorigenicitat, immunogenicitat i toxicitat (158). Aquests estudis s'haurien de planificar, dur a terme, monitoritzar, registrar i reportar seguint les Bones Pràctiques de Laboratori (BPLs) com a estàndard de qualitat.

En aquest sentit, primerament s'hauria de finalitzar l'etapa del disseny del producte d'ET. La col·locació d'una capa de substitut de duramàter comercial, seguida de la implantació del producte d'ET podria evitar l'impacte de partícules de DBM sobre el teixit neural i, per tant, asseguraria la preservació de la seva integritat. D'altra banda, l'administració d'aquests materials per via fetoscòpica, enlloc de la cirurgia

oberta, seria una bona alternativa per reduir l'agressió quirúrgica tant per a la mare com per al fetus (159).

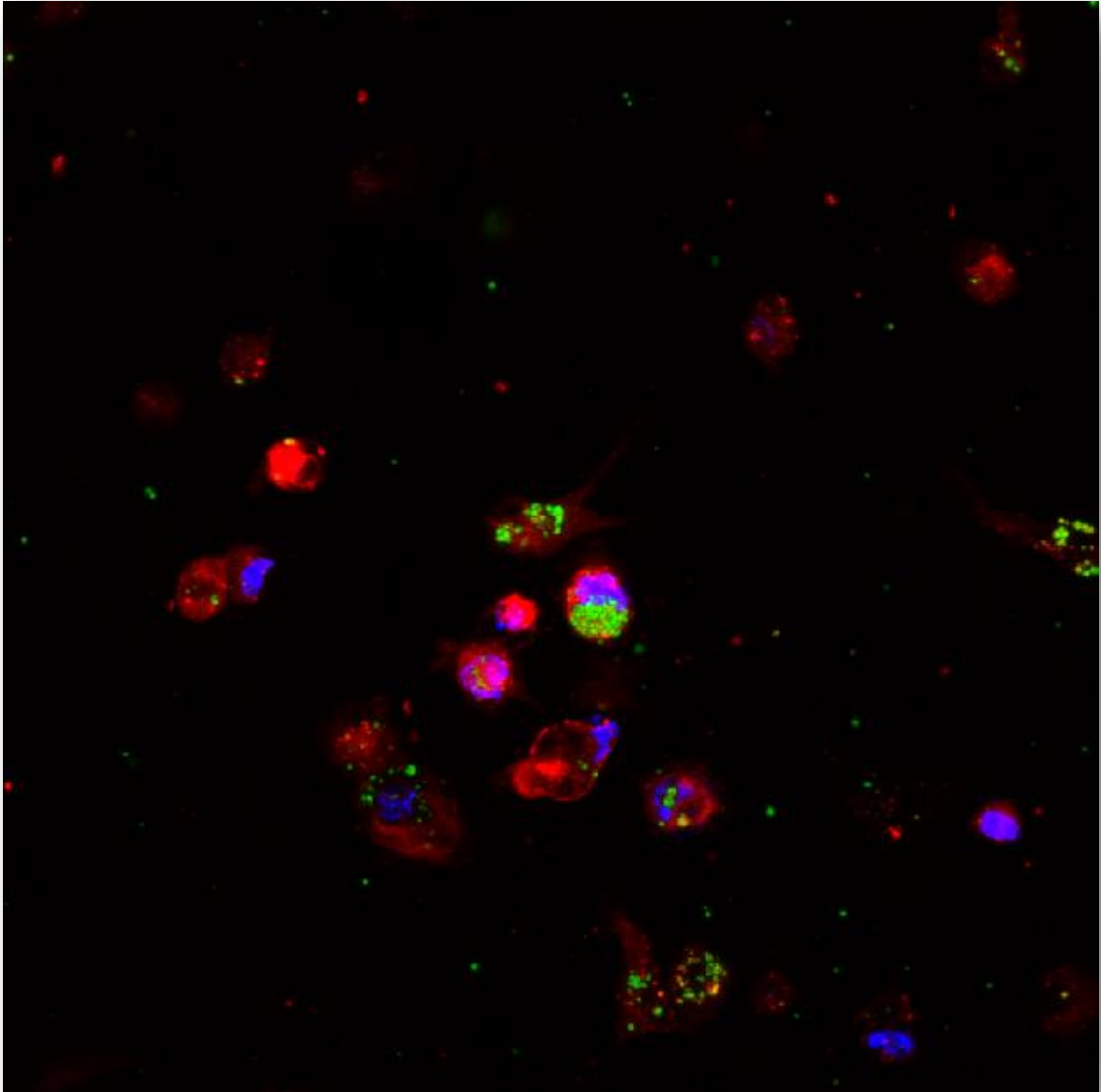
També s'hauria d'ajustar el bioprocés a partir de les AF-MSCs d'origen humà i avaluar la seva bioequivalència mitjançant la caracterització fenotípica i estudis de potència. El fet d'administrar les AF-MSCs marcades eGFP en el model animal ajudaria a comprendre millor el mecanisme d'acció de les cèl·lules implantades en la zona tractada.

Respecte al potencial immunogènic, tal com s'ha esmentat anteriorment les MSCs també procedents d'AF han demostrat tenir propietats immunomoduladores. No obstant això, la informació relativa al nostre producte cel·lular es podria obtenir a partir de diversos assajos *in vitro*, com la quantificació de l'expressió dels antígens d'histocompatibilitat (HLA) i els estudis d'inhibició de proliferació de limfòcits T.

Els estudis preliminars de marcatge de les AF-oMSCs amb MPIOs semblen indicar que les cèl·lules persisteixen en la zona de reparació del MMC. Tot i així, no es pot descartar que hagin pogut migrar a altres teixits. L'avaluació de la seguretat del producte en termes de persistència i biodistribució es podria dur a terme en un model animal petit com el ratolí immunodeficient, a través l'estudi de l'empelt ectòpic de les cèl·lules en teixits com el pulmó, les gònades, el fetge o la melsa.

També resulta crític avaluar el risc d'associat de tumorigènesi. Tot i que cada vegada més estudis avalen el baix risc de tumorigènesi associat a les MSCs, el fet que siguin d'origen extraembrionari, i per tant, més primitives, fa que puguin ser considerades més susceptibles a aquests fenòmens. El control del nombre de duplicacions cel·lular durant el procés productiu així com la caracterització citogenètica i genètica (expressió de c-myc, h-Tert, etc.) previ a la seva implantació podrien oferir un coneixement més ampli en aquest sentit.

En resum, aquest treball obre la porta a la fabricació d'un nou medicament de teràpia avançada amb potencial d'aplicació en la reparació del MMC durant el període fetal. A més, podria servir de base per a una nova línia d'investigació complementària dirigida específicament al tractament del teixit neural que ja es troba lesionat en el moment de la reparació prenatal i que significaria la curació de l'espina bífida.



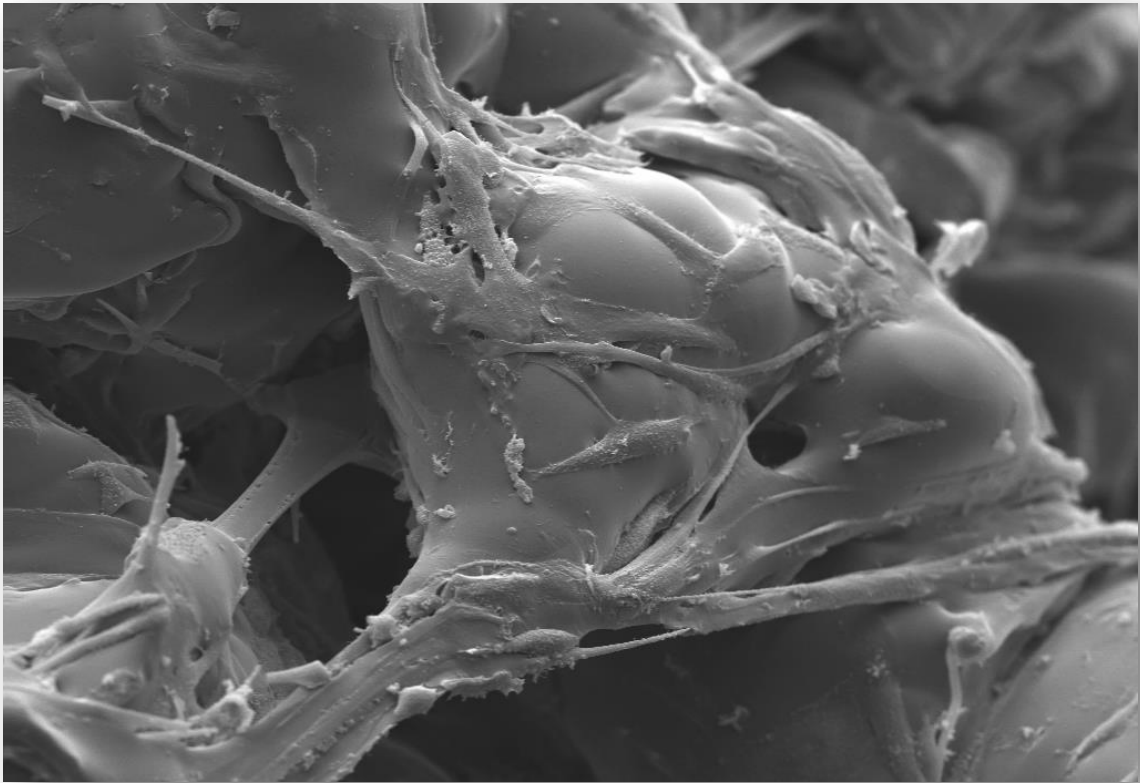
CAPÍTOL 8: CONCLUSIONS

En aquest treball de tesi doctoral s'han avaluat diferents productes d'enginyeria tissular basats en cèl·lules mesenquimals estromals autòlogues, obtingudes de líquid amniòtic per a la reparació prenatal del Mielomeningocele en un model d'ovella induït quirúrgicament. En base als resultats obtinguts, s'han extret les conclusions que es descriuen a continuació:

- I. A partir de mostres de líquid amniòtic oví, s'han aïllat i expandit *in vitro* cèl·lules que compleixen amb les característiques morfològiques, cinètiques, fenotípiques i funcionals de les cèl·lules mesenquimals estromals, segons els criteris establerts per la *International Society of Cellular Therapy*.
- II. La dosi clínica de cèl·lules mesenquimals estromals per a la reparació del Mielomeningocele fixada en $2-4 \times 10^6$ cèl·lules vives estromals ha demostrat tenir eficàcia terapèutica en el model animal. A partir de l'estratègia de cultiu desenvolupada, és possible assolir aquesta dosi cel·lular, en les aproximadament 3 setmanes que separen la cirurgia d'inducció i la cirurgia de reparació del Mielomeningocele.
- III. El protocol de marcatge de les cèl·lules mesenquimals estromals de líquid amniòtic oví amb micropartícules d'òxid de ferro posat al punt és eficient, manté les seves característiques morfològiques, una elevada viabilitat cel·lular, i no modifica el seu patró de creixement ni promou la inducció de fenòmens de senescència cel·lular.
- IV. Les cèl·lules amb contingut de ferro de la zona del Mielomeningocele del teixit oví es detecten a través d'imatges de ressonància magnètica i mitjançant tincions histològiques específiques fins a les set setmanes després de la seva administració. Tot i així, aquest tipus de marcatge no és vàlid per fer el seguiment de les cèl·lules mesenquimals estromals de forma específica, especialment en zones amb hemorràgia, per la presència de macròfags amb pigment hemosiderínic.
- V. Mitjançant tinció immunohistoquímica específica, és possible la detecció de cèl·lules mesenquimals estromals amb expressió positiva de la Proteïna Verda Fluorescent en el teixit oví del nostre model experimental, com a mínim 40 dies després de l'administració del producte d'enginyeria tissular.
- VI. Les cèl·lules mesenquimals estromals procedents de líquid amniòtic colonitzen les biomatrius d'àcid polilàctic-co-glicòlic de forma adequada, i a

més, en presència de medi de cultiu no sols s'hi mantenen adherides vives, sinó que es multipliquen fins a ocupar tota la seva superfície. No obstant això, l'aplicació d'aquest tipus de biomatriu no és apropiada per a la reparació prenatal del Mielomeningocele, ja que la seva manipulació és difícil i sembla lesionar els teixits de la zona tractada.

- VII. Les biomatrius de fibrina són adequades per vehiculitzar les cèl·lules mesenquimals estromals obtingudes de líquid amniòtic a la zona de reparació, ja que són biocompatibles, biodegradables, permeten la supervivència i proliferació de les cèl·lules en el seu interior, i s'adapten satisfactòriament a lesió del Mielomeningocele. Tot i això, la seva aplicació sobre el Mielomeningocele dona lloc a generació únicament d'una capa de teixit connectiu organitzat dens amb cobertura cutània en aquells animals que arriben a terme.
- VIII. La reparació del Mielomeningocele amb constructes fabricats amb matriu òssia desmineralitzada, fibrina i cèl·lules mesenquimals estromals de líquid amniòtic permet generar una estructura òssia similar a un arc vertebral posterior que tanca el defecte del Mielomeningocele. A més, el teixit ossi format s'integra dins de l'estructura anatòmica de forma natural rodejat per teixit connectiu, teixit adipós i cobertura cutània en els animals arribats a terme.
- IX. Els animals reparats amb el constructe fabricat amb matriu òssia desmineralitzada, fibrina i cèl·lules mesenquimals estromals de líquid amniòtic i que han evolucionat fins al final de la gestació han mostrat millor estat neurològic, sensitiu i motor, que els animals reparats amb biomatrius d'àcid polilàctic-co-glicòlic o fibrina.



CAPÍTOL 9: MATERIALS I MÈTODES

9.1. CIRURGIA D'INDUCCIÓ DEL MIELOMENINGOCELE

Per a dur a terme aquest treball experimental s'utilitzen ovelles (*Ovis aries*) adultes joves gestants de raça ripollesa procedents del proveïdor acreditat A.M. ANIMALIA BIANYA S.L. Tots els estudis s'han fet seguint el Real Decret 53/2013 (BOE nº 34, de 8 de Febrer, pàgina 11370, que transposa i desenvolupa la Directiva 2010/63/UE) i el Decret 214/1997 sobre protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres fins científics i amb l'aprovació del Comitè Ètic d'Experimentació Animal local (CEEA, Institut de Recerca de l'Hospital de la Vall d'Hebron).

Les ovelles gestants (n=41) a 75 (67-89) dies de gestació (terme=150 dies) es premediquen amb 0.5 mg/kg de midazolam plus (Dormicum[®], Roche) i 0.02 mg/kg de buprenorfina (Buprex[®], Schering-Plough S.A.) per injecció intramuscular a la corralina i al cap de 20 minuts es traslladen al quiròfan per dur a terme la preparació (rasurat i neteja) de la zona quirúrgica i col·locació d'un accés endovenós. Un cop els animals s'han traslladat al quiròfan, s'anestesien (inducció amb 5 mg/Kg IV de propofol (Propofol[®]-Lipuro 1%, BBraun Melsungen AG) i manteniment amb 3% d'isoflurà inhalat (Isoflo, Abbott Laboratories Ltd) i es prepara el camp quirúrgic a la zona abdominal.

S'obra la paret abdominal mitjançant laparotomia infraumbilical i s'exposa l'úter.

Es col·loquen dos punts tractors a la paret de l'úter i es fa una incisió longitudinal d'uns 5 cm amb coagulació per evitar sagnat i es cusen punts als extrems per evitar el desprendiment de les membranes uterines. Com que en aquest moment gestacional hi ha molt líquid amniòtic, s'extreuen dues o tres xeringues de 50 mL que es conserven estèrils. Tal com es detalla en *l'apartat 9.2. de Materials i Mètodes*, en aquesta fase es duu a terme la recollida del líquid amniòtic que serà el material de partida dels cultius cel·lulars.

A continuació, s'exposa el fetus oví a l'exterior per la part lumbar i es procedeix a resseccionar la pell, musculatura i l'arc vertebral posterior de tres últimes vèrtebres de la zona lumbar (Figura 9.1.) deixant el cordó medul·lar exposat. Finalment, s'obre la duramàter amb el bisell d'una agulla fina per permetre la sortida del líquid cefaloraquídi deixant el teixit neural exposat a l'exterior (63).

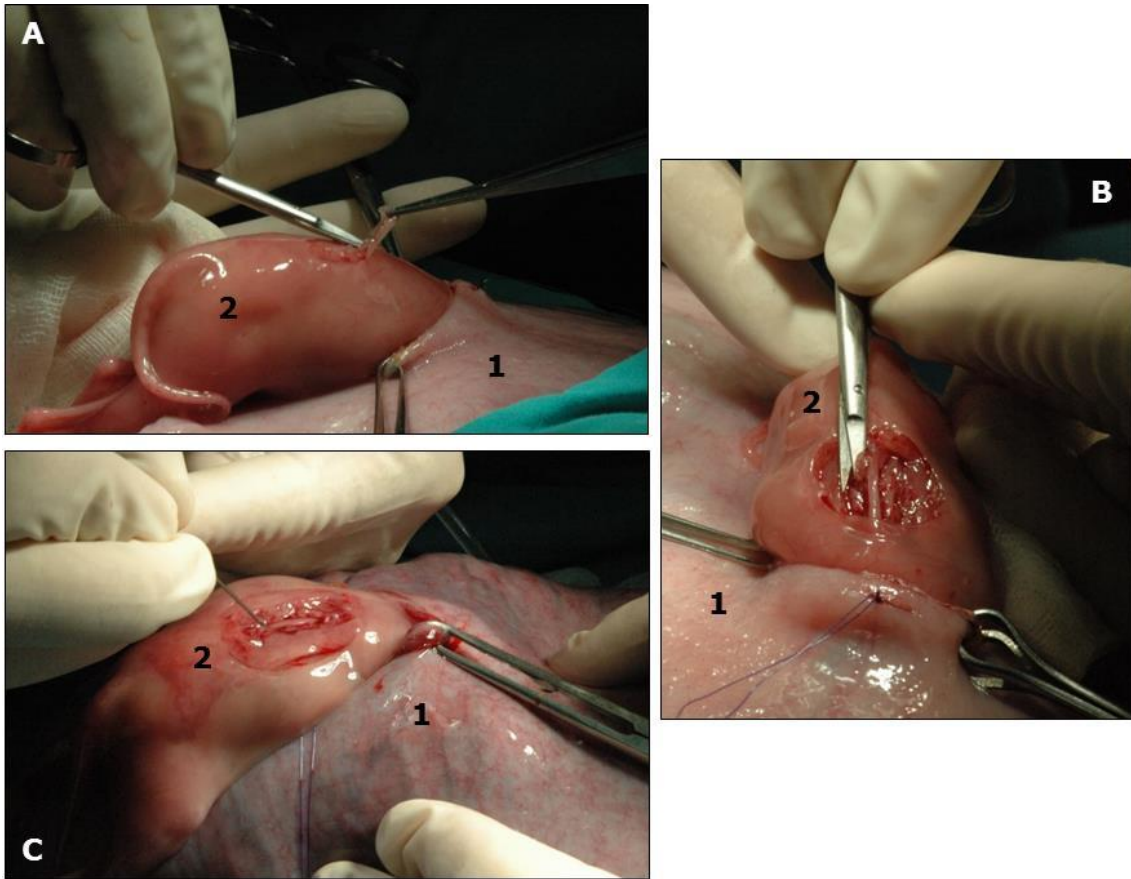


Figura 9.1. Inducció quirúrgica del Mielomeningocele del fetus oví 306: 1) Paret uterina, 2) Part posterior del fetus. La imatge mostra com es procedeix a la reseció de pell i musculatura (A), arcs vertebrals (B) i finalment a l'obertura de la duramàter amb una agulla fina (C).

Seguidament, s'introdueix el fetus a l'interior de l'úter i s'omple l'úter amb el líquid amniòtic obtingut durant l'abordatge quirúrgic i, si no es suficient, amb Ringer lactat (BBraun Melsungen AG) per evitar una situació d'oligoamni, i s'addiciona 50 mg de cefoxitina intrauterina (Normon Laboratories). Es sutura l'úter utilitzant una sutura continua i invaginada sobre sí mateixa per evitar adherències amb l'epíplon o nanses dels budells i l'úter s'introdueix de nou al seu lloc a la zona intrabdominopèlvica. Es tanca la paret abdominal per capes anatòmiques i la pell amb sutura intradèrmicament per amagar el fil de sutura i evitar la infecció de la ferida. Es reverteix l'anestèsia, s'aplica analgèsia (pegat cutani de Buprenorfina hidroclozur, Buprex®) i antibiòtic IM Ampicilina (Duphamox L.A., Fort Dodge) durant 48 hores i es torna l'animal a les corralines amb les altres ovelles.

La gestació es deixa evolucionar durant aproximadament tres setmanes per tal de que la lesió esdevingui crònica a l'esquena del fetus abans de fer la cirurgia de reparació del MMC. Durant aquest temps es fa un seguiment diari de l'estat de l'animal i la ferida cutània, a excepció dels diumenges.

9.2. RECOLLIDA DEL LÍQUID AMNIÒTIC OVÍ

El líquid amniòtic (AF) es recull i reserva en la cirurgia d'inducció del MMC per evitar el seu vessament i pèrdua durant les manipulacions del fetus. Aproximadament 80 mL es destinen als cultius cel·lulars i la resta s'introdueix de nou a l'interior de l'úter, ja que ha demostrat tenir propietats bacteriostàtiques (160).

La recollida del AF es fa mitjançant dues metodologies i s'avalua l'impacte de la tècnica en l'èxit del cultiu:

A) Mitjançant aspiració amb úter tancat, un cop la paret abdominal es troba oberta, per punció amb agulla a través de les parets de l'úter.

B) Mitjançant aspiració amb úter obert, directament amb xeringa a l'interior de l'úter.

Després de la recollida, les mostres destinades a cultiu s'emmagatzemen en condicions d'esterilitat i a temperatura ambient durant un màxim de 8 hores previ al seu processament.

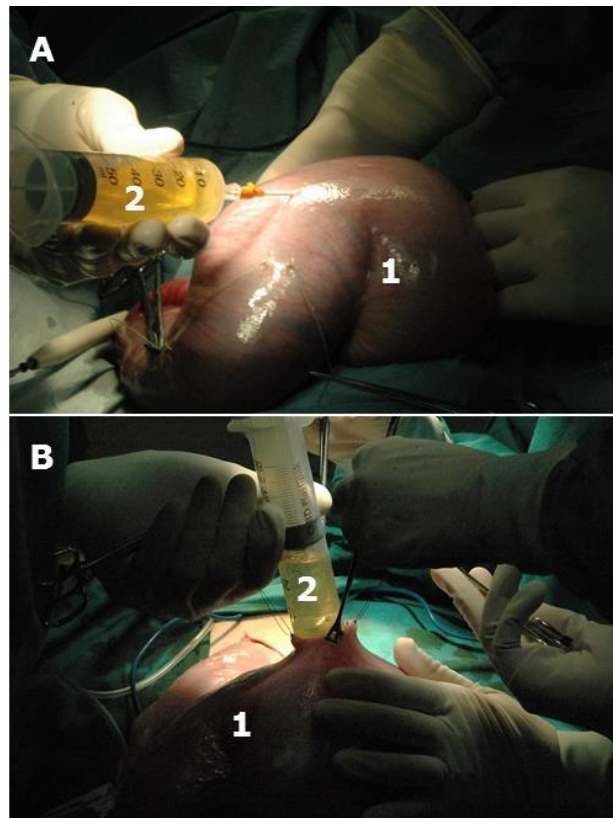


Figura 9.2. Recollida del líquid amniòtic per aspiració per punció a través de la mateixa (A) o per aspiració directa un cop la paret de l'úter està oberta (B): (1) Paret de l'úter, (2) Líquid Amniòtic.

9.3. AÏLLAMENT DE CÈL·LULES MESENQUIMALS ESTROMALS DE LÍQUID AMNIÒTIC

A partir de volums equivalents de mostra de AF, s'assagen dos protocols de sembra de les cèl·lules:

A) Sembra directa del AF;

B) Sembra de les cèl·lules després d'una etapa de concentració de l'AF que consisteix primerament en una centrifugació a 500 g (Jouan CR 3.12, Heraeus) durant 10 minuts a temperatura ambient, seguit d'un rentat amb 40 mL de PBS sense Ca^{2+} ni Mg^{2+} (Thermo Fisher Scientific Hyclone), i una segona concentració per centrifugació. Finalment, s'elimina el sobrenedant i el pellet cel·lular es resuspèn amb medi de cultiu fresc.

Els flascons de cultiu utilitzats contenen una superfície plàstica especialment tractada per a cultius de cèl·lules adherents (Corning). Després de 3 dies de cultiu, s'eliminen les cèl·lules no adherents i els debris cel·lulars. Les cèl·lules adherents es renten amb PBS (Gibco, Life Technologies) i es recanvia el medi cada 3-4 dies fins a dia 10 de cultiu. El medi de cultiu utilitzat està compost per M199 (Gibco) suplementat al 10% v/v amb serum boví fetal (FBS, Biological Industries), 5 ng/mL de basic fibroblast growth factor (bFGF; Cellgenix) i 1X de penicilina/estreptomomicina/amfotericina B (Ab/Am; Gibco, Invitrogen).

A dia 10, es recuperen les cèl·lules adherents mitjançant incubació amb Tripsina/EDTA 0,05% (Gibco, Invitrogen) a 37°C durant 10 minuts i es recompten fent ús de la cambra de Neubauer (Brand). La viabilitat de les cèl·lules tripsinitzades es determina pel mètode d'exclusió amb Blau de Tripà (Sigma). Els resultats s'expressen com a nombre de cèl·lules adherents aïllades per unitat de volum (mL) d'AF sembrat.

9.4. EXPANSIÓ DE LES AF- α MSCs

Per tal d'optimitzar l'expansió de les cèl·lules en cultiu, es testen les següents composicions del medi de cultiu:

A) M199 suplementat al 10% v/v FBS i 5 ng/mL bFGF: **medi basal**;

B) M199 suplementat al 10% v/v FBS i 10 ng/mL bFGF;

C) M199 suplementat al 10% v/v FBS i 15% v/v de medi Amniochrome II (Lonza). L'Amniochrome II és un medi de cultiu específic designat per estudis genètics prenatals i amb restricció per ús *in vitro*;

- D) M199 al 10% v/v FBS, 15 % v/v de medi Amniochrome II i 5 ng/mL bFGF;
- E) M199 al 20% v/v FBS i 15% v/v de medi Amniochrome II;
- F) Medi Amniochrome II.

A més a més, s'addiciona 1X Penicil·lina/Estreptomycina/Amfotericina (Ab/Am) a tots els medis descrits.

Els cultius s'inicien a una densitat de 2×10^3 cèl·lules vives/cm² en flascons de 25 cm² i amb 4 mL del corresponent medi de cultiu per flascó. Es fan recanvis de medi fresc a dia 3 de cultiu i, a dia 7, les cèl·lules es tripsinitzen, es recuperen i recompten.

Determinació dels paràmetres cinètics de les AF-oMSCs:

Per tal de determinar els paràmetres cinètics de creixement de les cèl·lules es duen a terme corbes de creixement.

En un primer bloc d'experiments, les cèl·lules AF-oMSCs es sembren a una densitat inicial de 2×10^3 cèl·lules vives/cm² en plaques de 6 pous en presència de medi de cultiu basal o medi Amniochrome II sense fer recanvis de medi (n=3).

La influència dels recanvis de medi de cultiu en el patró de creixement s'analitza en un nou bloc d'experiments, també utilitzant plaques de 6 pous i fent recanvis amb 1.5 mL de medi basal fresc per pou cada 2-3 dies (n=3).

Per a cadascuna de les condicions anteriors, les cèl·lules es sembren en els pous per triplicat, i es tripsinitzen a dia 0, 1, 2, 3, 4, 6, i 8 de cultiu per ser recomptades.

Les dades experimentals corresponents a la densitat cel·lular en cada temps s'ajusten mitjançant l'equació de Gompertz utilitzant el programa SigmaPlot (SigmaPlot 2002 per Windows, Versió 8.0). La velocitat màxima de creixement (μ_{\max} , dia⁻¹) en la fase exponencial s'ha calculat segons s'indica en la següent fórmula (161):

$$\mu_{\max} = \ln(N_f/N_i) / (t_f - t_i)$$

on N_i correspon a la densitat cel·lular inicial i N_f a la densitat en el moment de la tripsinització.

A més, també es determina el temps de duplicació cel·lular (t_d , dia) segons la següent expressió:

$$t_d = \ln(2) / \mu_{\max}$$

9.5. EXPANSIÓ DE AF-oMSCs PER OBTENCIÓ DE LA DOSI CLÍNICA

Per tal d'assolir la dosi clínica es porten cultius a gran escala a terme en dues fases:

- 1) Aïllament de les cèl·lules fibroblàstiques adherents de líquid amniòtic.
- 2) Expansió de les AF-oMSCs.

Per l'etapa d'aïllament, s'aplica únicament el protocol de sembra directa de l'AF. S'utilitza una superfície total de cultiu de 300 cm² (dos flascons de cultiu T150) i amb 0,27 mL de AF per cm² en medi basal. De nou, les cèl·lules no adherents, així com els debris cel·lulars es retiren mitjançant rentat amb PBS a dia 3 de cultiu i es recanvia el medi dues vegades a la setmana de forma consecutiva.

A dia 10 de cultiu, les cèl·lules adherents es tripsinitzen, recompten i es ressempren en nous flascons de cultiu. Per a l'etapa d'expansió, la superfície de cultiu total que s'empra va condicionada a la quantitat de cèl·lules obtingudes en l'etapa d'aïllament. Concretament, les cèl·lules es ressempren a una densitat inicial constant de 3000 cèl·lules vives/cm² i es cultiven durant 6-7 dies més fent també recanvis de medi fresc.

9.6. CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA PER CITOMETRIA DE FLUX

Es fa l'anàlisi immunofenotípic de 7 línies cel·lulars expandides en presència de medi basal.

S'incuben aproximadament 5×10^5 cèl·lules durant 15 minuts a temperatura ambient, amb els següents anticossos monoclonals: mouse anti-ovine CD44, CD45 i HLA-DR conjugats amb fluoresceïn isothiocyanate (FITC), mouse anti-ovine CD45 phycoerythrin (PE), and mouse anti-human CD166 PE (BD Pharmingen, San Diego, Ca, USA). A causa de la limitació de reactius comercials específics per l'espècie ovina, adicionalment es fan marcatges amb anticossos específics per a l'espècie humana i que formen part del panell proposat per la *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) per a la identificació de MSCs. Concretament, el CD90, CD105, CD73, CD166 i CD117. A la taula 9.1 es mostra la informació relativa als reactius utilitzats incloent-hi la casa comercial, referència, especificitat, clon, fluorocrom conjugat i l'isotip associat.

ANTICOS MONOCLONAL						
Receptor de membrana	Casa Comercial	Referència	Especificitat	Clon	Conjugació	Isotip associat
CD45	AbD Serotec	MCA2220PE	anti-ovine	1.11.32	PE	IgG1
CD44	AbD Serotec	MCA2219F	anti-ovine	25.32	FITC	IgG1
CD31	AbD Serotec	MCA1097F	anti-ovine	CO.3E1D4	FITC	IgG2a
HLA-DR	AbD Serotec	MCA2226F	anti-ovine	37.68	FITC	IgG2a
CD90	BD Pharmingen	555596	anti-human	5E10	PE	IgG1, k
CD90	Beckman Coulter	IM1840U	anti-human	F15-42-1-5	PE	IgG1
CD105	Caltag Laboratories	MHCD10504	anti-human	SN6	PE	IgG1
CD105	ABD Serotec	MCA1557F	anti-human	SN6	FITC	IgG1, k
CD166	BD Pharmingen	559263	anti-human	3A6	PE	IgG1
CD73	BD Pharmingen	550257	anti-human	AD2	PE	IgG1, k
CD117	Biologend	105808	anti-mouse	2B8	PE	IgG 2b
CD117	eBiosciences	MCA1841PET	anti-human	104D2	PE	IgG1, k

Taula 9.1. Llistat dels anticossos monoclonals utilitzats per dur a terme la caracterització immunofenotípica de les AF-oMSCs (FITC: Fluorescein isothiocyanate, PE: Phycoerythrin).

Després de la incubació, les cèl·lules es renten amb PBS suplementat al 1% v/v d'albumina (Grifols) i 0,1% v/v azida sòdica, i es fixen amb formaldehid a l'1% v/v en PBS. Les mostres marcades s'emmagatzemen a 4°C durant 24 hores, moment en el qual són analitzades.

Paral·lelament, es fa el marcatge de mostres de sang perifèrica ovina que serviran com a control positiu dels anticossos amb especificitat per a l'espècie humana. En aquest cas, el protocol té un pas addicional per llisar els eritròcits presents utilitzant la solució Red Blood Cell Lysis (Miltenyi Biotec) i així evitar que interfereixin en l'adquisició i anàlisi.

Les mostres s'adquireixen al citòmetre de Flux FACSCalibur (Becton Dickinson) i són analitzades amb Programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

Tal com es mostra en la figura 9.3., l'anàlisi de les AF-oMSCs s'inicia a partir d'un primer dot plot amb paràmetres corresponents a grandària i complexitat (SSC/FSC) en el que es descarten els debris cel·lulars (R1) i es selecciona la població d'interès (R2). A continuació, s'utilitza el control isotípic per excloure la tinció inespecífica i marcar el llindar de positivitat per FITC en un dot plot Counts/FITC (FL1). Finalment, es carreguen les mostres marcades amb els anticossos conjugats en

FITC i es determina el percentatge de positivitat per a cadascun dels marcadors (M2). Com a mínim es capturen 3000 events de la regió corresponent a les cèl·lules per a cadascuna de les adquisicions.

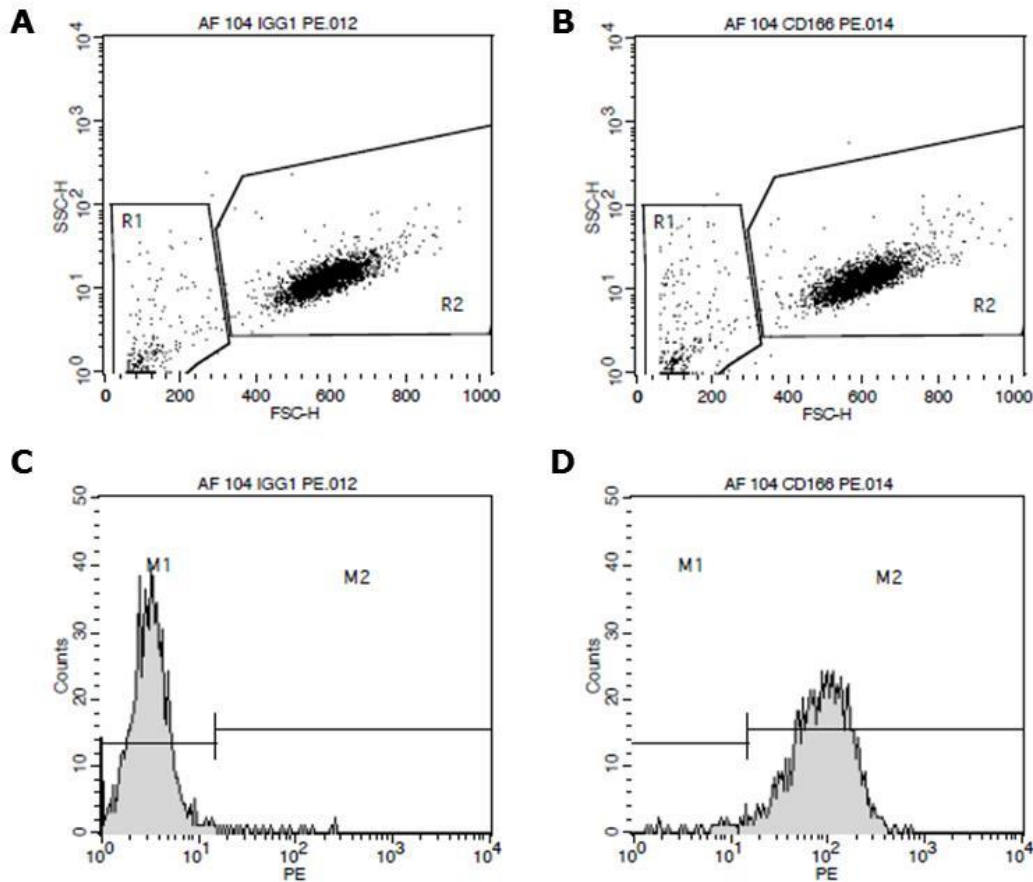


Figura 9.3. Exemple d’anàlisi citomètric del marcador de superfície CD166 en les AF-oMSCs de la línia AF 104: A i C) Isotip, B i D) Mostra. En el primer histograma SSC/FSC (A i B) es selecciona la població d’interès (R2) i es representa en el segon histograma Counts/PE (C i D) en què s’analitza l’expressió del marcador.

Es repeteix el mateix procediment per a les mostres marcades amb anticossos conjugats en PE, utilitzant un histograma Counts / PE (FL2).

Els resultats es mostren mitjançant un histograma amb superposició entre la mostra marcada amb cadascun dels anticossos i l’isotip corresponent.

9.7. CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE LES AF-oMSCs

El potencial de diferenciació de les AF-oMSCs expandides s’assaja promovent la diferenciació osteogènica, condrogènica i adipogènica *in vitro* de les cèl·lules en presència medis de diferenciació comercials. Com a control negatiu, es cultiva les AF-oMSCs en medi basal en paral·lel a cadascun dels cultius de diferenciació.

9.7.1. DIFERENCIACIÓ OSTEOGÈNICA

Per tal de promoure la diferenciació osteogènica, es sembren les oAF-MSCs per duplicat a una densitat inicial de 2×10^4 cèl·lules/cm² en plaques de 12 pous (3,8 cm²/pou) i amb medi basal (0,5 mL/pou). Passades 24 hores, el medi s'elimina juntament amb les cèl·lules no adherides a la superfície plàstica i s'afegeix medi comercial d'inducció osteogènica (0,5 mL/pou) (StemPro[®] Osteogenesis Differentiation Kit, Invitrogen), que es recanvia dues vegades per setmana.

Després de 4 setmanes, s'avalua l'acumulació de fosfat càlcic mineralitzat mitjançant tinció Von Kossa. Breument, les cèl·lules es renten amb PBS i aigua destil·lada, i s'incuben amb nitrat de plata al 5% p/v (Sigma) durant 30 minuts sota llum ultraviolada. Seguidament, les cèl·lules es renten tres vegades amb aigua destil·lada i s'examina la deposició de les sals al microscopi òptic.

9.7.2. DIFERENCIACIÓ CONDRÒGÈNICA

La diferenciació condrogènica s'ha induït a partir de la formació d'un pellet amb 1×10^6 AF-oMSCs en un tub de polipropilè de 15 mL. Les cèl·lules es centrifuguen dues vegades a 500 g durant 10 minuts per eliminar la solució de tripsinització i substituir-la totalment per medi d'inducció condrogènic (StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit, Invitrogen). El pellet cel·lular, altrament anomenat *micromass pellet*, es manté a 37°C, 5% CO₂ i 90% d'humitat relativa durant 3 setmanes. El medi es recanvia dues vegades per setmana amb molta cura, per tal de no pertorbar l'estructura del micromass pellet. Una vegada finalitzat el temps d'inducció, el pellet es fixa amb paraformaldehid al 4% v/v (Sigma-Aldrich) i es parafina. Es fa la tinció amb Blau Alcà (Fluka, Sigma-Aldrich) del talls del pellet de 3 µm de gruix seguint el protocol descrit en l'apartat 9.16.1. *Tincions Histològiques* d'aquest mateix i s'avalua la presència de glucosaminoglicans (GAGs).

9.7.3. DIFERENCIACIÓ ADIPOGÈNICA

Les cèl·lules AF-oMSCs subjecte a diferenciació adipogènica es sembren per duplicat en plaques de 12 pous a una densitat inicial de 2×10^4 cèl·lules/cm² i es cultiven amb medi de diferenciació comercial (StemPro Adipogenesis Differentiation Kit, Invitrogen), fent de nou, recanvis de medi cada 3-4 dies. Després de 3 setmanes, les cèl·lules es fixen amb paraformaldehid al 4% v/v, es renten amb PBS i es tenyeixen amb colorant Oil Red O (Sigma) pre-atemperat a 37°C durant 10 minuts. Finalment, mitjançant visualització al microscopi, s'avalua la presència de gotes lipídiques a nivell intracel·lular.

9.8. ASSAIG D'UNITATS FORMADORES DE COLÒNIES FIBROBLÀSTIQUES

Es duu a terme l'assaig d'unitats formadores de colònies fibroblàstiques (CFU-F) a partir de 8 mostres d'AF. Per a cada mostra, es sembra el volum d'AF que conté 5×10^4 i 1×10^5 cèl·lules en plaques de Petri de 35 mm grided (Nunc, Thermo Scientific) per triplicat i s'addiciona 1 mL de medi basal per placa.

Després de 10 dies sense haver recanviat el medi de cultiu, les cèl·lules es fixen i tenyeixen pel mètode de Panòptic Ràpid (Química Clínica Aplicada S.A.). Aquesta tinció diferencial utilitza tres reactius:

- Solució 1: Alcohòlica de triarilmetà
- Solució 2: Tamponada de xantè
- Solució 3: Tamponada de tiazina

La solució 1 fixa la mostra, la solució 2 dóna coloració violeta al nucli cel·lular i amb la solució 3 es tenyeix el citoplasma cel·lular de color blau.

El criteri que s'aplica per definir una CFU-F és que estigui formada per com a mínim 40 cèl·lules fibroblàstiques. La freqüència de CFU-Fs es calcula en base al número total de cèl·lules de l'AF sembrades.

9.9. MARCATGE AMB MICROPARTÍCULES D'ÒXID DE FERRO

De forma general, per dur a terme el marcatge de les AF-oMSCs s'utilitza una suspensió de Micropartícules magnètiques d'Òxid de Ferro fluorescentes (MPIOs) de $1.63 \mu\text{m}$ de mida i conjugades amb Dragon Green (Bangs Laboratories, Inc; Referència: ME04F). S'utilitzen dos lots, el lot 8998 que té una concentració de $2,605 \times 10^9$ MPIOs/mL i el lot 9486 amb concentració de $2,801 \times 10^9$ MPIOs/mL.

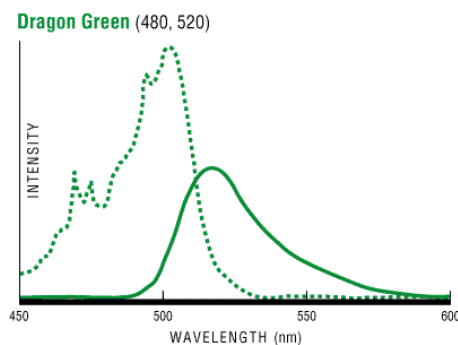


Figura 9.4. Espectre d'excitació i emissió del colorant fluorescent Dragon Green que correspon al visible (verd).

A causa de l'alta concentració d'MPIOs en la solució comercial, es prepara una dilució 1/10 de la solució comercial d'MPIOs en PBS i 1X Ab/Am com a solució de treball. A partir d'aquesta solució es pren el volum corresponent a la concentració de marcatge desitjada que s'afageix al medi M199 basal (M199 + Ab/Am 1X + 10% v/v FBS + 5 ng bFGF) que alimenta les cèl.lules en cultiu i s'incuba a 37°C, 5% CO2 i 95% d'humitat relativa durant 20-24 hores.

9.9.1. DEFINICIÓ INICIAL DEL PROTOCOL MARCATGE DE AF-oMSCS AMB MPIOs

Per definir la concentració òptima d'MPIOs a utilitzar durant el marcatge cel·lular, es sembren AF-oMSCs a una densitat inicial de 3×10^4 AF-oMSCs/cm² en sis flascons T25 (Corning, NY, USA) per a cada línia cel·lular testada. L'endemà de la sembra, es recanvia el medi de cultiu i les AF-oMSCs s'incuben en presència de concentracions creixents d'MPIOs: 0, 25, 50, 100, 250 i 500 MPIOs/AF-oMSC.

- Exemple de càlcul del volum de solució de treball d'MPIOs pel marcatge:

$$\frac{((3 \times 10^4 \text{ AF-oMSCs/cm}^2 * 25 \text{ cm}^2 * 250 \text{ MPIOs/AF-oMSC}) * (1 \times 10^3 \text{ } \mu\text{L/mL}))}{(2,801 \times 10^8 \text{ MPIOs/mL})} = 669,4 \text{ } \mu\text{L}$$

El volum de la solució de treball d'MPIOs, el volum de medi M199 basal i la concentració de MPIOs/mL es detallen en la Taula 9.2.:

Concentració marcatge (MPIOs/AF-oMSC)	Volum dil 1/10 MPIOs (µL)	V total en T25 (mL)	MPIOs/mL
0	0	3,3	N.A.
25	67,0		5,28x10 ⁶
50	133,9		1,05x10 ⁷
100	267,8		2,11x10 ⁷
250	669,4		5,27x10 ⁷
500	1338,4		1,05x10 ⁸

Taula 9.2. Càlcul del volum de solució de treball d'MPIOs i concentració final al flascó de cultiu T25 per marcar les AF-oMSCs fins a 500 MPIOs/AF-oMSC.

Passades 20-24h, es verifica l'endocitosi de les MPIOs mitjançant visualització del cultiu en un microscopi de fluorescència (Nikon; Ph1 10X i PhL 4X).

Seguidament, les AF-oMSCs marcades es tripsinitzen, es recompten a la cambra de Neubuer i s'avalua la viabilitat amb Blau de Tripà. La determinació del grau de

marcatge cel·lular es fa per citometria de flux fent ús de l'equip FACSCalibur (Becton Dickinson). El Dragon Green, fluorocrom conjugat a les MPIOs, i es detecta per FL1 (Figura 9.5.).

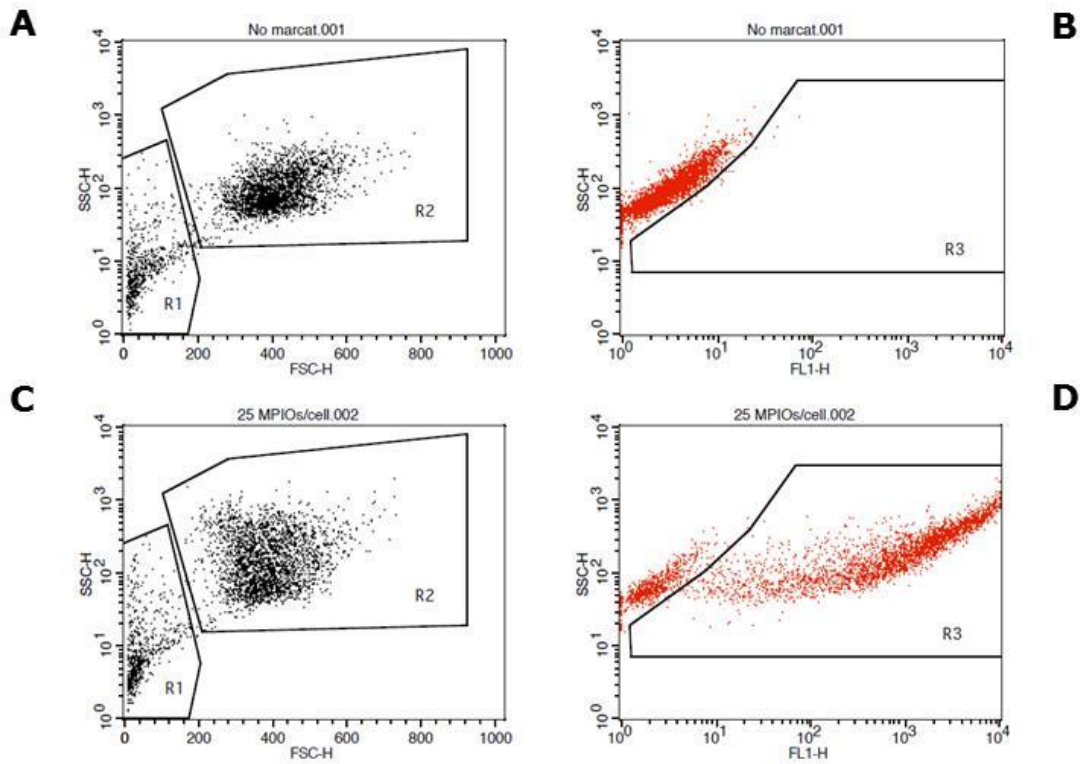


Figura 9.5. Exemple d'anàlisi citomètric per avaluar el percentatge de AF-oMSCs sense marcar (A i B) i marcades amb 25 MIOs/AF-oMSC (C i D). En el primer histograma SSC/FSC (A, C) es selecciona la població d'interès (R2) i es representa en el segon histograma SSC/FL1 (B, D) en què s'analitza el percentatge de AF-oMSCs positives (R3).

L'experiment es repeteix per a quatre línies cel·lulars diferents (AF 122, AF310, AF87787 i AF87884).

9.9.2. ESTUDI DEL PATRÓ DE CREIXEMENT DE LES AF-oMSCS MARCADES

A continuació, s'estudia el patró de creixement de les AF-oMSCs marcades a partir de les solucions cel·lulars anteriors. Concretament, es resembren les AF-oMSCs marcades de nou en flascó T25 a una densitat inicial de 3×10^3 cèl·lules/cm² i es mantenen en cultiu durant 7 dies (final de la fase exponencial), fent recanvis de medi fresc cada 2-3 dies. Passat aquest temps, les AF-oMSCs es tripsinitzen, recompten i s'avalua el factor d'expansió i nombre de duplicacions associat, tenint en compte un temps de latència d'un dia. Aquests valors es calculen utilitzant les següents fórmules:

$$\text{Factor d'expansió (Fexp)} = N_f / N_i;$$

Nombre de Duplicacions (ND)=1/td

En aquest cas, l'experiment també es repeteix per a les quatre línies cel·lulars anteriorment esmentades.

9.9.3. ESTABILITAT DE LES MPIOs EN LES AF-oMSCs EN CULTIU

Per tal d'avaluar la pèrdua del marcatge durant les divisions cel·lulars, a més, s'analitza el percentatge de AF-oMSCs marcades en les solucions cel·lulars anteriors, obtingudes després de 7 dies en cultiu. Es determina per citometria de flux seguint el mateix protocol descrit en l'apartat 9.9.1. de *Materials i Mètodes*.

9.9.4. ESTUDI DE SENESCÈNCIA DE LES CÈL·LULES MARCADES

Adicionalment, també es porta a terme un assaig per avaluar la presència de cèl·lules senescentes en les solucions marcades fins a 500 MPIOs i cultivades durant 7 dies utilitzant el kit comercial Cellular Senescence Assay Kit (Chemicon International). Aquest kit proporciona els reactius requerits per detectar l'activitat β -galactosidasa associada a senescència (SA- β -gal), que és induïda en cèl·lules senescentes a diferència de cèl·lules quiescents o en proliferació. En aquest assaig, la SA- β -gal catalitza la reacció d'hidròlisi de l'X-gal que resulta en l'acumulació de coloració blava en les cèl·lules senescentes.

En aquest cas, s'avaluen únicament les sis solucions d'AF-oMSCs de la línia AF 87884, les quals es sembren a una densitat inicial de 1×10^4 cèl·lules/cm² en placa de 24 pous (Corning). Després de 3 dies de cultiu, es retira el medi de cultiu, es fa un rentat amb PBS i s'afegeixen 0.5 mL/pou de solució de fixació 1X i s'incuba durant 10-15 min a temperatura ambient. Seguidament, es fan dos rentats amb PBS i es preparen 3,5 mL de la solució de detecció de SA- β -gal (Taula 9.3.), de la qual s'afegeixen 0,5 mL/pou.

REACTIU	VOLUM (mL)
Reactiu de tinció A (10X)	0,245
Reactiu de tinció B (10X)	0,245
Solució X-gal	0,061
PBS	2,949

Taula 9.3. Components i volums per preparar 3.5 mL de la solució de detecció de SA- β -gal.

Es continua amb la incubació del reactiu de revelat durant 4 hores a 37°C i en fosc. Després es fan dos rentats finals amb PBS i es procedeix a l'observació al

microscopi per tal de quantificar el nombre de cèl·lules que han adquirit coloració blava.

9.9.5. EFECTE DE LA DENSITAT CEL·LULAR EN CULTIU EN EL MARCATGE

El present experiment pretén determinar si la densitat de les cèl·lules en cultiu durant la incubació amb una concentració constant d' MPIOs té efecte sobre l'èxit del marcatge i, per tant, del percentatge resultant de AF-oMSCs marcades.

S'utilitzen cèl·lules AF-oMSCs aïllades i expandides amb medi M199 basal. Les cèl·lules resembren en flascons de cultiu corning de 25 cm² de superfície en presència de 3,3 mL de medi basal a cinc densitats inicials diferents: 5,0x10³, 1,0x10⁴, 2,0x10⁴, 3,0x10⁴ i 3,5x10⁴ AF-oMSCs/cm². L'endemà, es recanvia el medi de cultiu i s'afageix el volum de solució de marcatge corresponent a 100 MPIOs/AF-oMSC.

- Exemple de càlcul del volum de solució de marcatge:

$$5 \times 10^3 \text{ cèl·lules/cm}^2 * 25 \text{ cm}^2 * \text{cèl·lula/100 MPIOs} * \text{mL/} 2,6 \times 10^8 \text{ MPIOs} = 0,048 \text{ mL}$$

Densitat cel·lular (AF-oMSCs vives/cm ²)	Volum dil 1/10 MPIOs (µL)	Vtotal en flascó (mL)	MPIOs/mL
5,0x10 ³	48,1	3,3	3,79x10 ⁶
1,0x10 ⁴	96,2		7,58x10 ⁶
2,0x10 ⁴	192,3		1,52x10 ⁷
3,0x10 ⁴	288,5		2,27x10 ⁷
3,5x10 ⁴	336,5		2,65x10 ⁷

Taula 9.4. Càlcul del volum de solució d'MPIOs i concentració final de MPIOs/mL en el flascó T25 per marcar les cèl·lules en cultiu amb 100 MPIOs/AF-oMSC.

9.9.6. DETECCIÓ DEL MARCATGE AMB MPIOs MITJANÇANT RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR

9.9.6.1. Preparació de les mostres

A) Phantoms:

Per avaluar la sensibilitat de la tècnica es porten a terme tres experiments en què es prepara un gel d'agarosa a l'1% p/v (Invitrogen; Life Technologies) que conté solucions de AF-oMSCs marcades en diferents condicions.

En el primer experiment, les concentracions de marcatge oscil·len de 0 a 50 MPIOs/AF-oMSC. Es pren com a valor màxim 50 MPIOs/AF-oMSC, perquè ens

interessa avaluar si podem detectar concentracions baixes d'MPIOs, sobretot tenint en compte que els estudis presentats anteriorment suggereixen que part del marcatge fet inicialment amb 100 MPIOs/AF-oMSC es perd.

L'experiment s'inicia amb la sembra de AF-oMSCs de la línia AF 122P a passi 1 i a una densitat inicial de $1,5 \times 10^4$ cèl·lules vives/cm² en set flascons T75. A les 48 hores, es tripsinitza un dels flascons per fer un control de la densitat de sembra i a partir del valor obtingut ($2,0 \times 10^4$ cèl·lules /cm²) es calcula la quantitat de MPIOs a afegir per a cadascuna de les condicions, a partir de la solució de treball que en aquest cas es troba a concentració de $1,3 \times 10^8$ MPIOs/mL.

FLASCÓ DE CULTIU	MPIOs/AF-oMSC	VOLUM (µL)
1	0	0,0
2	1	11,5
3	5	57,6
4	10	115,2
5	25	288,0
6	50	576,0

Taula 9.5. Càlcul del volum de solució de treball d'MPIOs per marcar els cultius fins a 50 MPIOs/AF-oMSC.

Després de 24 hores, les cèl·lules es tripsinitzen i concentren per obtenir solucions cel·lulars marcades a una concentració de 1.0×10^6 AF-oMSCs/mL en medi M199 basal.

A continuació, es prepara el recipient plàstic (Figura 9.6.A) on s'immobilitzen les cèl·lules per dur a terme la detecció per RM. La preparació s'inicia fixant 7 tubs eppendorf de volum nominal 1,8 mL a la base i lateral del recipient. Seguidament, es diposita una primera capa d'uns 2 cm d'agarosa a l'1% líquida que envolta els tubs i alhora ajuda a subjectar-los. Un cop ha solidificat, s'introdueixen 500 µL de l'agarosa dins de cada eppendorf i una nova capa d'agarosa externa als tubs.

El següent pas, un cop l'agarosa ha solidificat, és barrejar 200 µL de cada solució cel·lular amb la mateixa quantitat d'agarosa líquida i es diposita a dins del corresponent tub eppendorf obtenint la següent configuració (phantoms):

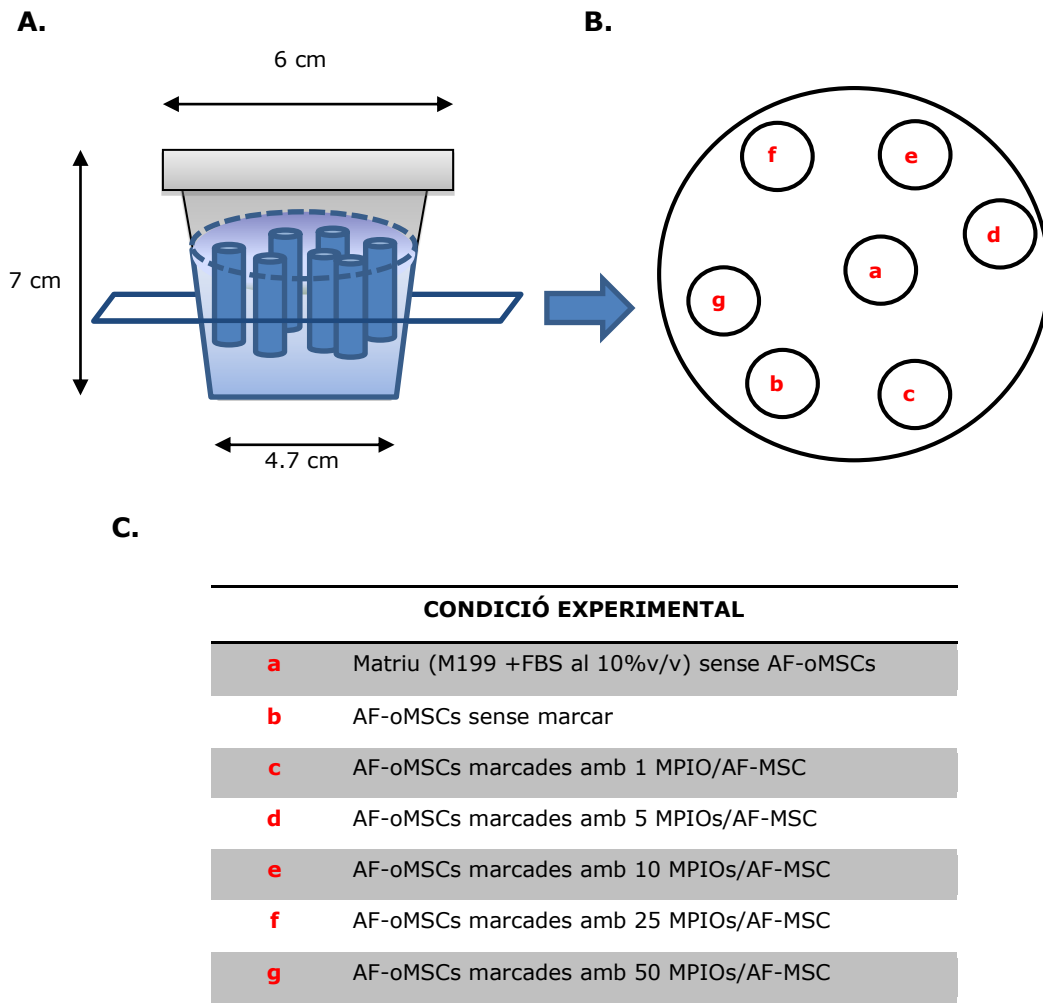


Figura 9.6. Fotografia del recipient contenidor de solucions d'AFoMSCs marcades a diferents concentracions. A: Visió lateral del recipient plàstic; B: Secció transversal amb la disposició dels phantoms, C: Descripció de les solucions que s'introdueixen a cadascun dels tubs eppendorfs (a-g).

El medi de cultiu sense AF-oMSCs (Fig 9.6.C (a)) i una solució de AF-oMSCs sense marcar (Fig 9.6.C (b)) s'utilitzen com a controls. Finalment, s'acaba de recobrir l'interior i exterior dels eppendorfs amb agarosa fins a completar l'alçada del recipient. Un cop solidificat el recipient, s'emmagatzema a temperatura ambient fins l'endemà, que es fa l'anàlisi al Servei de Ressonància Magnètica Nuclear (seRMN) de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Amb aquesta construcció s'aconsegueix tenir, en un únic suport, les diferents solucions separades i poder obtenir una única imatge on comparar els diferents phantoms, tot evitant distorsions a causa de les desigualtats de camp magnètic que puguin donar-se, al seu torn, per diferències de susceptibilitat magnètica entre aire i contingut de les mostres.

En el segon experiment, es prepara un nou recipient que contingui un sol tub amb una suspensió cel·lular de la línia AF 122P a passí 2 marcada amb 1 MPIO/AF-oMSC (i que correspon a un 10% de cèl·lules marcades). La preparació es fa seguint el mateix procediment descrit anteriorment.

POSICIÓ	Suspensió cel·lular marcada amb 5 MPIOs/AF-oMSC		Suspensió cel·lular no marcada	
	%	Volum (μ L)	%	Volum (μ L)
1	100	400	0	0
2	75	300	25	100
3	50	200	50	200
4	25	100	75	300
5	10	40	90	360
6	1	4	99	396
7	0	0	100	400

Taula 9.6. Preparació de suspensions cel·lulars fruit de la combinació en diferents proporcions de les AF-oMSCs no marcades i les marcades amb 5 MPIOs/AF-oMSC.

El tercer experiment consisteix en avaluar si és possible detectar la pèrdua de senyal en un nou recipient que conté 7 suspensions cel·lulars resultants de la combinació, en diferents proporcions, d'una suspensió de cèl·lules marcades a 5 MPIOs/AF-oMSC i una suspensió de AF-oMSCs sense marcar tal com es descriu en la Taula 9.6. En aquest cas, les cèl·lules procedeixen d'un estoc de AF-oMSCs criopreservades de la línia AF F109P, que es sembren i cultiven durant 3 dies previ al marcatge amb MPIOs. De nou, les AF-oMSCs marcades es tripsinitzen i les solucions cel·lulars s'immobilitzen en gel a l'1% d'agarosa.

B) Vèrtebres dels neonats ovins:

Es preparen vèrtebres individuals envoltades per gel d'agarosa a l'1% en un recipient plàstic tal com s'ha descrit anteriorment.

Les primeres dues mostres que s'avaluen són per posar a punt la tècnica amb teixit animal, és a dir, definir les condicions d'adquisició per tal d'identificar els diferents tipus de teixit presents, així com la presència de MPIOs i són les següents:

- Vèrtebra de l'ovella 106 reparada amb biomatriu de PLGA sense cèl·lules.
- Vèrtebra de l'ovella 106 a la qual se li ha injectat *ex vivo* 150 μ L d'una solució cel·lular de $5,8 \times 10^5$ AF-oMSCs de la línia AF O16P marcades amb 100 MPIOs/cell.

La resta de vèrtebres que s'analitzen procedeixen directament dels animals reparats que es vol avaluar.

9.9.6.2. Adquisició i anàlisi de les mostres

Els estudis d'imatge per RMN es fan en un espectròmetre Bruker BioSpec 70/30 USR de 7 Tesla (Bruker BioSpin GmbH) equipat amb un set de gradients de mini-imatge (400 mT/m) i una sonda de volum polaritzada circularment (amb diàmetre interior de 72 mm). Totes les dades de IRM s'adquireixen i processen en un ordinador amb sistema operatiu Linux utilitzant el programa ParaVision 5.0 (Bruker BioSpin GmbH).



Figura 9.7. Espectròmetre Bruker BioSpec 70/30 USR de 7 Tesla (Bruker BioSpin GmbH, Karlsruhe, Alemanya).

El protocol experimental consisteix en adquirir primer unes imatges de referència en tres orientacions ortogonals per localitzar les regions d'interès. Aquestes imatges s'obtenen utilitzant una seqüència RARE ("rapid acquisition with relaxation enhancement") en els plans axial (9 seccions), sagital (7 seccions) i coronal (7 seccions) amb els següents paràmetres experimentals: temps de repetició (TR)= 2000 ms, temps d'eco efectiu (TE_{eff})= 36 ms, factor d'acceleració RARE (RARE) = 8, gruix de la secció (ST)=1 mm, mida de la matriu (MTX)=256 x 256, i camp de vista (FOV)= 6 x 6 cm².

S'adquireixen imatges d'alta resolució espacial ponderades en T2 y T2* en plans transversals als phantoms (solucions cel·lulars marcades) i a la medul·la espinal (vèrtebres ovines). Les imatges ponderades en T2 s'adquireixen usant una

seqüència RARE ($TR/TE_{eff}=4000/20ms$) i les imatges ponderades en $T2^*$, usant una seqüència FLASH ("fast low angle shot") a dos temps d'eco diferents ($TE=7$ y 12 ms, $TR=300$ ms, angle de gir= 30°). L'augment de temps d'eco en una freqüència enfatitza la pèrdua de senyal dels teixits amb temps de relaxació transversal ($T2$) curts, tal com succeeix en el cas de les AF-oMSCs marcades amb MPIOs. Els paràmetres de geometria són els mateixos per a totes les imatges d'alta resolució ($MTX=512 \times 512$, $FOV=7 \times 7$ cm², 10 seccions d'1 mm de gruix).

9.9.7. DETECCIÓ DEL MARCATGE AMB MPIOs MITJANÇANT TINCIÓ DE PERL'S

Aquest mètode s'aplica tant en cèl·lules en cultiu (per posar a punt la tècnica) com directament sobre els talls histològics del teixit del neonat oví que ha estat tractat amb AF-oMSCs marcades amb MPIOs. Es segueix el protocol descrit en l'apartat 9.16.1. *Tincions Histològiques*.

9.10. MARCATGE I SEGUIMENT DE LES AF-oMSCs AMB PROTEÏNA VERDA FLUORESCENT

El protocol de marcatge de les AF-oMSCs amb eGFP parteix de la utilització de la línia cel·lular empaquetadora de partícules virals 293 GPG modificada (cedida per Dr. Ory, Washington University, Saint Louis, MO, EUA).

La línia 293 GPG deriva de la línia humana HEK 293 (epiteli de ronyó embrionari), la qual es fàcilment transfectable, i se li han introduït els gens necessaris per generar vectors recombinants: gag i pol del virus de la leucèmia de Moloney murina (MoMLV) i el que codifica per la proteïna G del virus de l'estomatitis vesicular (VSV-G), motiu pel qual se l'anomena GPG. La VSV-G és una proteïna fusogènica que no pot ser expressada de manera estable a causa de la seva toxicitat. Per aquest motiu, funciona sota un sistema d'expressió induïble Tet-off. És a dir, la proteïna VSV-G s'expressa únicament quan es deixa d'afegir Tetraciclina (Tet) al medi de cultiu i, com a conseqüència, es formen sincitis i produeixen grans quantitats de partícules virals (162).

Aquesta línia empaquetadora es va infectar al Laboratori de Teràpia Gènica i Cel·lular de la Fundació de Recerca de l'Hospital de la Vall d'Hebron liderat pel Dr. Jordi Barquinero. Es va utilitzar un vector pseudotipat amb l'embolcall del virus de la leucèmia del gibó (GALV), que té tropisme per cèl·lules humanes i que conté: els LTR del MoMLV, la seqüència d'encapsidació psi (Ψ), i la eGFP. Es van seleccionar els clons que produïen els títols virals més alts i es van criopreservar per a futures aplicacions. Aquestes línies són productores de vectors retrovirals (293GPG/eGFP), i

es mantenen en presència de tetraciclines fins al moment de la generació de vectors.

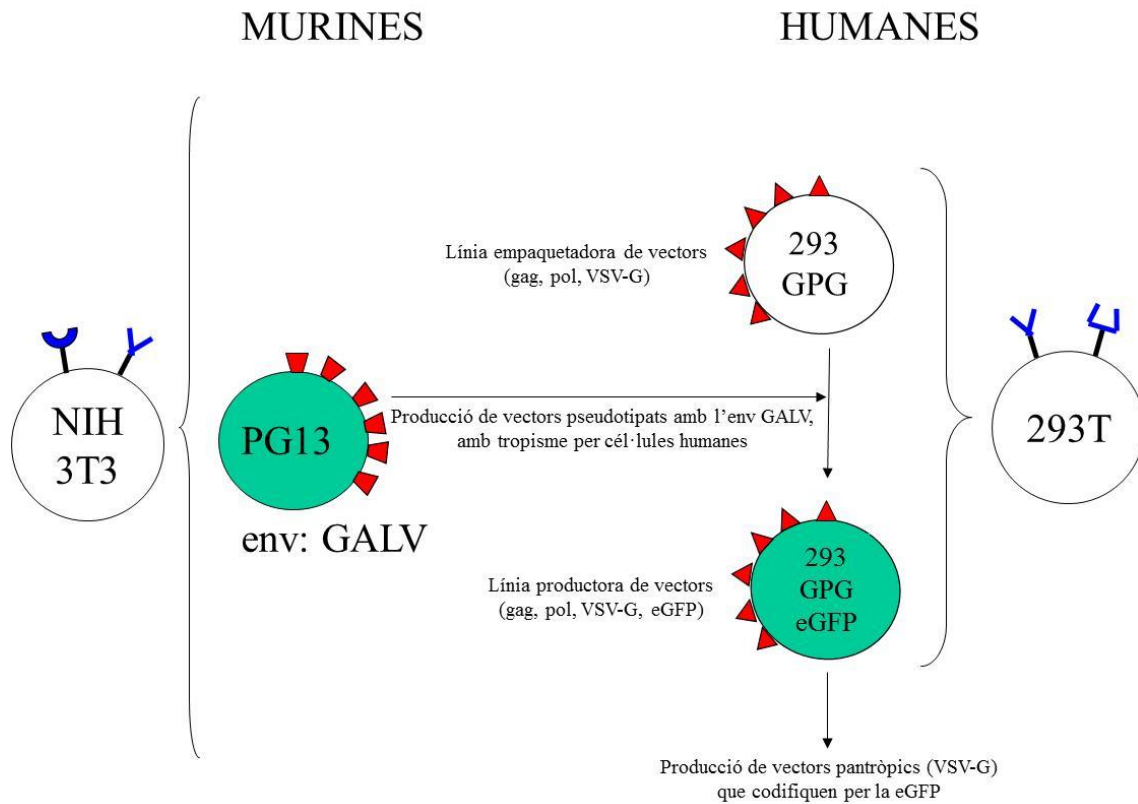


Figura 9.8. Esquema de les modificacions introduïdes a la línia empaquetadora 293 GPG per convertir-les en productora de partícules virals VSV-G/eGFP.

9.10.1. TRANSDUCCIÓ DE LES AF-oMSCS

El protocol s'inicia amb el cultiu en paral·lel de les cèl·lules productores 293GPG/eGFP i l'aïllament i expansió de les AF-oMSCs. Els passos següents es descriuen a continuació (Figura 9.8.):

9.10.1.1. Cultiu de les cèl·lules 293GPG i obtenció del sobrenedant viral VSV-G eGFP

1. Les cèl·lules productores 293GPG/eGFP es descongelen, es sembren i es cultiven en presència de DMEM-HG (PAA, Pasching, Austria) suplementat al 10% amb FBS Gold (PAA), 2 mM L-Glutamina (L-Glu; PAA), 50 UI/mL Penicilina/Streptomicina 1X (P/S; PAA) i 1 µg/mL Tet (Sigma) fins a obtenir una alta densitat.
2. Una vegada crescudes, es tripsinitzen i ressembren a una densitat de $1,5 \times 10^5$ cèl·lules/cm² en dos flascons T150 amb 20 mL de medi sense tetraciclina per tal d'afavorir la formació de sincitis cel·lulars i activar la producció de partícules virals.
3. Cada 1-2 dies, es recanvia el medi utilitzant aquesta vegada medi M199 basal.

4. A dia 4 des de la retirada de la tetraciclina, es comprova la formació de sincitis i s'obté el sobrenedant dels cultius, que conté els vectors VSV-G (identificat com **SBD D4**) i de nou s'afegeixen 20 mL M199 basal fresc a cada flascó. El medi sobrenedant reservat, aproximadament 40 mL, es filtra amb un filtre de grandària de porus 0,45 µm (Whatman® FP30/0.45, GE Healthcare Life Sciences), per tal d'eliminar la possible contaminació amb cèl·lules.
5. L'endemà (dia 5 des de la retirada de la Tet), s'obté de nou el sobrenedant (identificat com **SBD D5**), es filtra i els cultius es descarten.

9.10.1.2. Aïllament, expansió i transducció de les AF-oMSCs

1. S'inicia l'aïllament de les AF-oMSCs amb la sembra del AF en dos flascons T150. Un cop finalitzada aquesta fase, les AF-oMSCs es tripsinitzen i ressemblen en dos flascons T150 a una densitat inicial d'aproximadament 3×10^3 cèl·lules/cm² (passi 0).
2. Passats 1-2 dies, es recanvia el medi M199 basal.
3. A dia 3, es fa el primer de cicle de transducció substituint el medi de cultiu pel SBD D4 descongelat i suplementat amb 0,25 mL de bFGF i 80 µL de sulfat de protamina (Laboratorios Farmacéuticos ROVI S.A., Madrid, Espanya). El Sulfat de Protamina (polisacàrid i policatió amb càrrega positiva) afavoreix la unió dels vectors i les AF-oMSCs, ambdós amb una membrana de carga negativa.
4. A les 24 h, es duu a terme el segon cicle de transducció repetint el procediment indicat en el punt anterior i utilitzant l'SBD D5.
5. Les cèl·lules es tripsinitzen l'endemà i s'obté mostra per recompte i viabilitat cel·lular, així com per determinar el percentatge de AF-oMSCs positives per eGFP mitjançant citometria de flux.
6. Les AF-oMSCs transduïdes es ressemblen (Passi 1) i cultiven fins a obtenir la dosi clínica.
7. En aquest moment, les AF-oMSCs es tripsinitzen, i es torna a agafar mostra per recompte i viabilitat cel·lular i per repetir la quantificació del percentatge de AF-oMSCs positives per eGFP.
8. La suspensió d'AF-oMSCs es concentra, es resuspèn amb PPP i es prepara el constructe amb el DBM per a la reparació del MMC.

En paral·lel, es cultiven AF-oMSCs de la mateixa línia cel·lular sense transduir en un flascó T25 que serveixen com a control negatiu (CN) en l'anàlisi per citometria de flux.

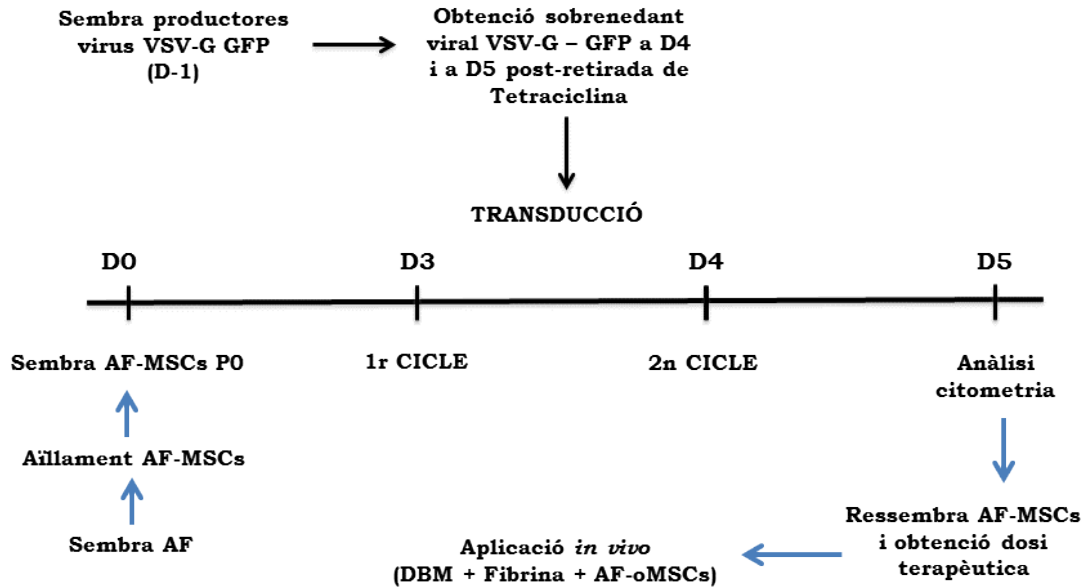


Figura 9.8. Esquema del protocol de transducció d'AF-oMSCs amb sobrenedant viral 293GPG/eGFP de les cèl·lules destinades a la reparació del MMC en el model animal.

9.10.2. DETECCIÓ DE LES AF-oMSCS MARCADES AMB eGFP PER CITOMETRIA DE FLUX

Per temes organitzatius, la quantificació de les AF-oMSCs marcades amb eGFP es fa l'endemà de l'obtenció de les mostres. Les mostres s'emmagatzemen a 2-8 graus en foscor i el protocol següent és el següent:

1. Es dipositen 100 μ L de cada mostra en un tub de citometria de 5 mL (BD, Franklin Lakes, NJ, USA): suspensió d'AF-oMSCs transduïdes i suspensió d'AF-oMSCs CN.
2. S'addiciona 1 μ L de 7AAD (Molecular Probes) a cada tub i s'incuba durant 5 minuts a T.A. i en foscor.
3. S'adquireixen les mostres al citòmetre de flux FACSCalibur utilitzant el programa CellQuest, capturant un mínim de 10.000 events de la població d'interès.
4. Seguidament, es fa l'anàlisi de la mostra en el programa FCS Express de la següent manera:
 - En el primer histograma SSC/FSC es delimita la regió que conté la població cel·lular d'interès (Figura 9.9. A i B).
 - En el segon histograma 7AAD/SSC es determina el percentatge de cèl·lules viables (Figura 9.9. C i D; regió 7AAD negativa).
 - Les AF-oMSCs viables es representen en el tercer histograma eGFP/SSC, on es quantifica la població positiva per eGFP (Figura 9.9. E i F; regió eGFP⁺).

9.10.3. DETECCIÓ AF-oMSCS MARCADES AMB eGFP EX VIVO

La detecció de les AF-oMSCs marcades amb eGFP en els fetus ovins reparats amb aquestes cèl·lules es fa a partir de les mostres de les vèrtebres parafinades mitjançant tècniques immunohistoquímiques, tal com es descriu en l'apartat 9.16.2.E) d'aquest mateix capítol.

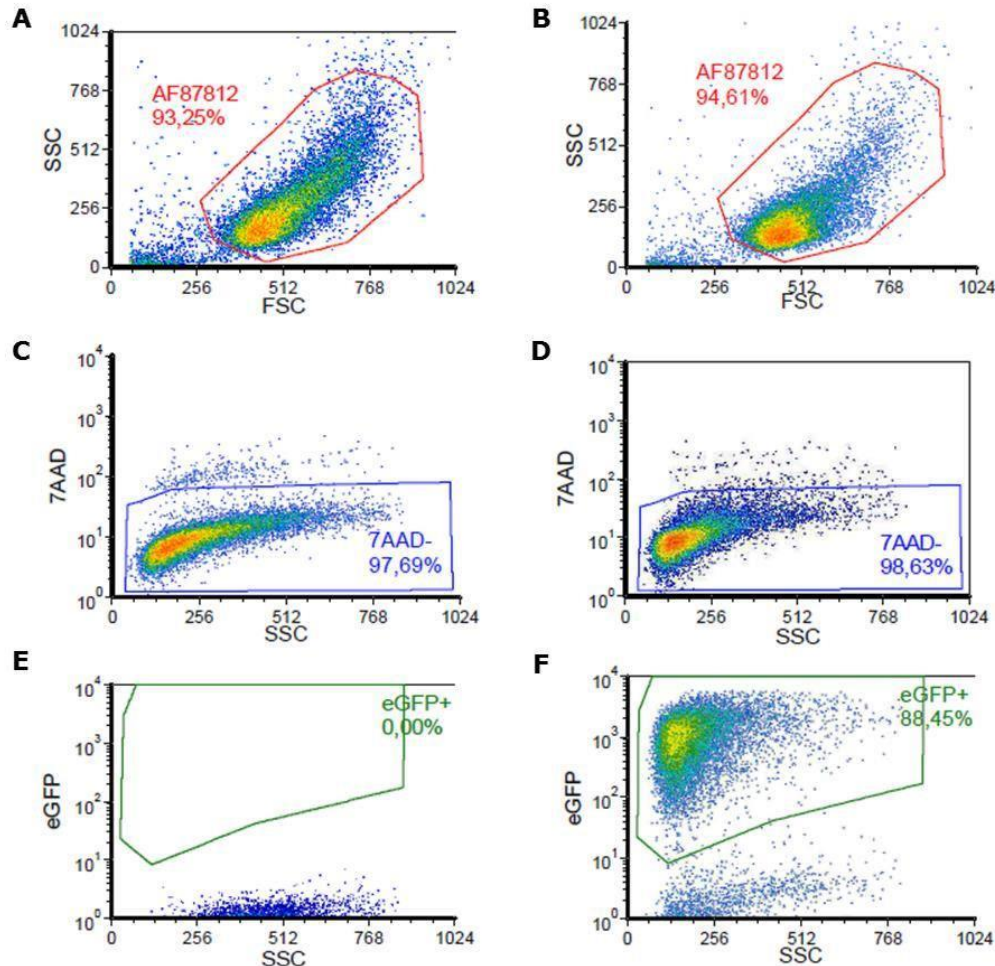


Figura 9.9. Exemple d'anàlisi de les AF-oMSCs transduïdes per quantificar el percentatge de cèl·lules positives per eGFP: CN (A, C, E) i mostra d'AF-oMSCs transduïdes (B, D, F).

9.11. COLONITZACIÓ DE BIOMATRIUS PLGA AMB AF-oMSCs

9.11.1. MANUFACTURA DE LES BIOMATRIUS

Per dur a terme aquesta part experimental, s'ha treballat amb matrius biocompatibles d'àcid polilàctic-glicòlic (PLGA) manufacturades al Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona (135, 163). Es caracteritzen per ser hidrofòbiques, tenir una mida de 1,5 x 2,0 x 0,2 cm (llarg x ample x alçada) i una porositat d'entre 300 i 500 μm .

Breument, la seva fabricació consisteix en:

1. Primerament es diposita el clorur sòdic (NaCl), que actuarà de porogen, al tamissador durant 30 minuts per seleccionar les partícules de la mida desitjada (0.3-0.5 nm).
2. Tot seguit, dins una campana d'extracció de gasos, es dissol 0.5 g de PLGA (50/50, NP Pharm) amb 7.5 mL de cloroform en un vas de precipitats amb l'ajut d'un agitador magnètic.
3. A continuació, es passa la dissolució a un vidre de rellotge i es va afegint poc a poc 4.5 g de NaCl prèviament tamisat. S'homogeneïtza amb l'ajuda d'una espàtula.
4. El cloroform es va evaporant i a conseqüència el polímer es va solidificant.
5. Quan està prou manejable, es moldeja el polímer per tal d'obtenir les biomatrius en les dimensions i forma requerida.
6. Es deixa evaporar tot el cloroform deixant les biomatrius tota la nit a temperatura ambient en un vidre de rellotge pla.
7. L'endemà, es renta la biomatriu amb aigua destil·lada i s'introdueix en un vas de precipitats gran ple d'aigua, per tal que es dissolgui tota la sal i es generin els porus. Es recanvia l'aigua sovint durant 24 hores i després es deixen assecar.
8. Les biomatrius s'empaqueten de forma individual i es congelen a -80°C durant 24 hores.
9. Un cop congelades, es liofilitzen i així s'aconsegueix eliminar traces del dissolvent orgànic (cloroform).
10. Finalment, s'esterilitza mitjançant radiació gamma a una potència variable entre 15 i 25 KGy (Aragogamma).

Les biomatrius fabricades s'emmagatzemen a -30°C fins al moment que es fan servir.

S'han utilitzat un total de 21 matrius incloent els estudis *in vitro* i les utilitzades per aplicació en el model animal de tres lots diferents (lots 20110801, 170609 i 260609).

9.11.2. COLONITZACIÓ DE LES BIOMATRIUS AMB AF-oMSCS

Per dur a terme la colonització, les AF-oMSCs en cultiu es tripsinitzen, es recompten i s'analitza la viabilitat i com a màxim 4×10^6 AF-oMSCs vives (dosi clínica màxima) es porten a la concentració desitjada per la colonització, que segons l'experiment oscil·la entre 1.0×10^5 i 5.0×10^5 AF-oMSCs vives/mL en medi basal. En cap cas, cèl·lules descongelades han estat utilitzades per a la colonització de les biomatrius.

Per altra banda, és important comentar, que les AF-oMSCs poden haver estat marcades a una concentració de 100 MPIOs/AF-oMSC.

Es testen tres metodologies de colonització de les biomatrius de PLGA:

9.11.2.1. Colonització en sistema no agitat

El procés s'inicia hidratant la matriu descongelada durant aproximadament 1 hora en medi basal. Després la biomatriu de PLGA es posa en contacte amb la solució cel·lular, 2×10^6 AF-oMSCs en un volum de 250 μ L, utilitzant com a suport un pouet d'una placa de cultiu sense tractament per cultiu cel·lular i s'incuba en sistema no agitat a 37°C durant 1 hora (h). Passat aquest temps, s'aspira la solució que envolta la biomatriu, es diposita de nou a sobre i s'incuba 1 hora més. Un cop finalitzat aquest temps es fa la visualització de la biomatriu de PLGA mitjançant microscòpia confocal per fer una valoració inicial qualitativa del grau d'adherència cel·lular. I seguidament, es procedeix al rentat amb medi basal i condicionat final de la matriu.

A partir de les cèl·lules presents al sobrenedant de la colonització i a la solució de rentat, es calcula el percentatge de colonització:

$$\text{Percentatge colonització (\%)} = \frac{((V_i \times C_i) - (V_{sbd} \times C_{sbd} + V_{sr} \times C_{sr}))}{(V_i \times C_i)} \times 100$$

On: V=Volum, C=Concentració cel·lular, sbd =sobrenedant de la colonització i sr = solució de rentat.

9.11.2.2. Colonització en sistema agitat mitjançant centrifugació

Es diposita la biomatriu de PLGA prèviament hidratada al fons d'un tub Falcon de 50 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). A continuació s'introdueix la solució cel·lular sobre la matriu i es fa un primer cicle de centrifugació a 500 g durant 2 minuts (min) per afavorir l'entrada de les AF-oMSCs a través dels porus de la matrius. A continuació, es pren la solució cel·lular que envolta la biomatriu, es diposita de nou sobre biomatriu i es repeteix el procediment.

A continuació, es fa una etapa d'incubació en sistema no agitat a 37°C durant 2 hores per aconseguir l'adherència de les cèl·lules a la superfície de la matriu. Finalment, la matriu es renta i condiona, i es recuperen les cèl·lules no adherides per tal de recomptar-les i calcular el percentatge de colonització.

9.11.2.3 Colonització en sistema agitat fent ús de l'equip MACSMix de Miltenyi

La colonització de la matriu de PLGA amb AF-oMSCs en sistema agitat fent ús de l'equip MacsMix (Milteny Biotech) es fa a 37°C, al 5% de CO₂ i 90% d'Humitat relativa.

El programa de l'equip escollit combina cicles de 5 minuts en repòs per afavorir l'adherència cel·lular a la biomatriu, seguit d'un temps curt de 30 segons en moviment (aproximadament 12 rpm) i rotació per resuspendre les cèl·lules que hagin sedimentat i permetre de nou el contacte de les cèl·lules amb la matriu.

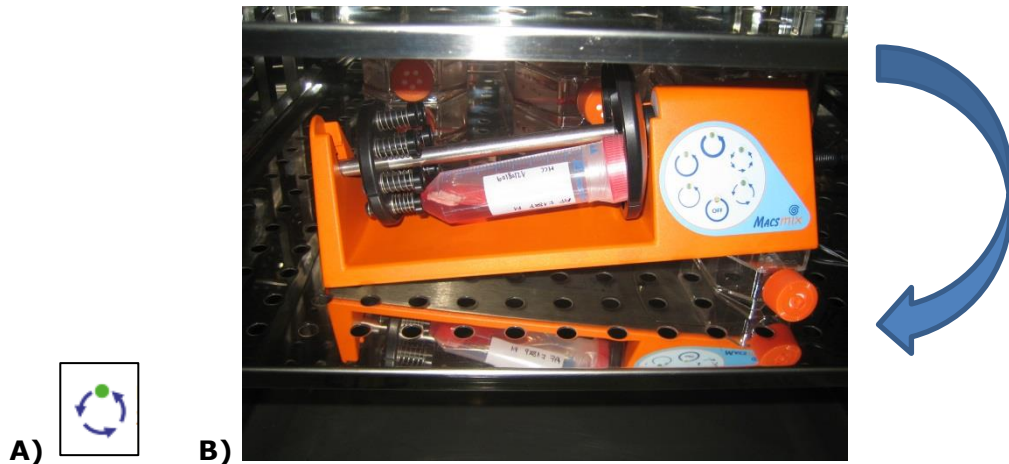


Figura 9.10. A) Tecla identificativa del programa de l'equip MACS Mix que s'utilitza durant la colonització en sistema agitat, B) Colonització de la biomatriu de PLGA amb AF-oMSCs F122P P4.

9.11.3. ESTUDIS PER MICROSCÒPIA CONFOCAL DE FLUORESCÈNCIA

Primerament, destacar que a causa del fet que no es disposava de material específic per posar a punt la metodologia de marcatge amb els colorants utilitzats, les condicions de marcatge s'han anat ajustant en cadascun dels experiments fets.

Per altra banda, comentar que la tinció dels nuclis i citoplasma cel·lulars es fa un cop finalitzada la colonització de les biomatrius.

9.11.3.1. Marcatge de les mostres

A) Tinció del citoplasma cel·lular

Per tenyir el citoplasma de les AF-oMSCs es fa servir el kit comercial PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma) que inclou la solució stock del colorant fluorescent PKH26 (1 nM) i el diluent C. El colorant fluorescent PKH26 s'incorpora de forma estable dins les regions lipídiques de la membrana cel·lular i el diluent C és el vehicle del marcatge està format per una solució aquosa iso-osmòtica sense contingut en salts, detergents o solvents orgànics no fisiològics i que està formulat per maximitzar la solubilitat del colorant i l'eficiència del marcatge.

El protocol de marcatge consisteix en les següents etapes:

1. Es renta la biomatriu de PLGA colonitzada amb 2 mL de PBS per eliminar les restes proteiques procedents del sèrum.
2. Es prepara el reactiu de tinció amb 1 μ L del colorant fluorescent vermell PKH26 en 3 mL de diluent C.
3. S'addiciona sobre la matriu i s'incuba durant 5 minuts a la foscor i a temperatura ambient.
4. Un cop passat aquest temps, s'afegeix sobre el constructe 3 mL de FBS (Biological Industries) per parar la reacció.
5. En cas de voler procedir a fer una tinció específica per nuclis, es fa un rentat final amb 2 mL de PBS.

B) Tinció del nucli cel·lular

En els primers experiments, es fa la tinció nuclear amb DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; Sigma Aldrich). Com que volem fer estudis d'estabilitat durant com a mínim una setmana, es busca un colorant específic per assajos amb cèl·lules viables i de baixa toxicitat. És per aquest motiu, que posteriorment es decideix substituir el DAPI pel colorant Vibrant® Violet Dye Cycle™ (Molecular Probes; Life Technologies).

- DAPI:

El DAPI és un colorant d'àcids nucleics blau fluorescent que s'uneix preferiblement a les dobles hèlix de DNA i més concretament a les parelles AT situades al solc menor de la cadena. La fluorescència és directament proporcional a la quantitat de DNA present i la seva emissió màxima és a la longitud d'ona de 460 nm.

El protocol de marcatge seguit es descriu a continuació:

1. Es prepara extemporàniament una dilució $1/10^4$ de la solució stock amb 1 μ L de reactiu i 10 mL de PBS, per aconseguir una solució a concentració 300 nM.
2. S'aplica 2 mL de la solució estoc sobre la matriu durant 5 minuts en foscor.
3. Es retira el colorant i es renta amb 2 mL de PBS.

- Vibrant® Violet Dye Cycle™:

El colorant violeta Vybrant® DyeCycle™ és un colorant permeable que també s'uneix a la doble hèlix del DNA i que pot ser utilitzat per l'estudi del cicle cel·lular i assajos de proliferació en cèl·lules vives, seguiment de les cèl·lules i també anàlisis per citometria de flux. Es caracteritza per ser precís, presentar baixa toxicitat i

s'aplica a través d'un protocol simple i robust. La seva longitud d'ona d'emissió és d'aproximadament 440 nm. Els passos que es segueixen són els següents:

1. Després de bloquejar el PKH26, s'afegeix a la solució 2 µL del colorant Vybrant® Violet DyeCycle™.
2. S'incuba durant 30 minuts a 37°C i en foscor.
3. La biomatriu es renta amb 2 mL de PBS.

Una vegada ha finalitzat la tinció amb els colorants específics, la matriu es diposita en un pouet d'una placa de 6 pous amb fons de vidre (MatTek Corporation), es recobreix amb PBS i un cobreobjectes per mantenir la matriu tocant el fons del pouet.

9.11.3.2. Adquisició i anàlisi de les mostres

S'utilitza l'equip Spectral Confocal Microscope FV1000 (Olympus). Es fa una observació global de la preparació a 20X i s'escullen com a mínim 4 camps representatius.

S'adquireixen les imatges de fluorescència cada 10 µm (800 x 800 punts rastrejats; Zstep size de 1,5 µm); entre 30-50 seccions òptiques o plans focals, segons el gruix de la matriu en cada camp.

Addicionalment, en alguns casos també es fa l'adquisició amb zoom 2, augmentant la resolució de la imatge (per exemple: de 0,795 a 0,397 µm /píxel).

El làser utilitzat durant l'adquisició depèn de la combinació de marcatges fets: per a AF-oMSCs marcades amb MPIOs s'utilitza el làser d'Argó Blau (488 nm). En cas de que s'hagi tenyit també el citoplasma cel·lular amb DAPI o Vybrant® Violet DyeCycle™, s'adquireix el marcatge làser violeta (405 nm) i, finalment, si a més s'ha tenyit el citoplasma cel·lular amb PKH26 s'adquireix amb el làser verd (561 nm).

L'anàlisi de les mostres es fa utilitzant el programa Flouview (versió 1.7.) del mateix equip FV1000.

9.11.4. ESTUDIS PER MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA

Per mostrar la porositat i la presència de cèl·lules a l'interior de la biomatriu de PLGA, es fa l'observació amb microscòpia electrònica d'escanejat.

Les biomatrius colonitzades amb AF-oMSCs a diferents concentracions es fixen en gluteraldehid al 2.5% v/v (EM grade; Merck) en buffer fosfat (PB; 0.1M, pH 7.4; Sigma-Aldrich) durant aproximadament 12 hores a 4°C. Després de quatre rentats

de 10 minuts cadascun amb PB, les mostres es fixen amb tetraòxid d'osmi a l'1% p/v (TAAB Lab) en PB durant 2 hores a 4°C. Seguidament, les mostres es sotmeten de nou a quatre rentats amb aigua i es deshidraten passant per solucions a concentració creixent d'etanol (30, 50, 70, 90, 95 i 100%), i assecat per punt crític amb CO₂. A continuació, les mostres es munten sobre una matriu metàl·lica amb capes adhesives de carbó, es recobreixen amb or i s'observen al Microscopi Electrònic d'Escanejat Evo MA 10 (Zeiss) operant a 20 kV.

S'observa la totalitat de la preparació i finalment es prenen imatges de diferents zones representatives a diferents augments (100X-700X).

9.12. PREPARACIÓ DE LES BIOMATRIUS DE FIBRINA

9.12.1. OBTENCIÓ DE PLASMA POBRE EN PLAQUETES A PARTIR DE SANG PERIFÈRICA D'OVELLA

Es recullen 20-30 mL de sang perifèrica de l'ovella gestant en tub amb citrat sòdic (BD Vacutainer). Abans de les 12 hores, els tubs amb sang es centrifuguen a 2500 g i temperatura ambient durant 10 minuts (Jouan CR 3.12, Heraeus).

Es retira la tercera part superior del plasma de cadascun dels tubs, que correspon al plasma pobre en plaquetes (PPP) i es diposita en un tub falcon estèril.

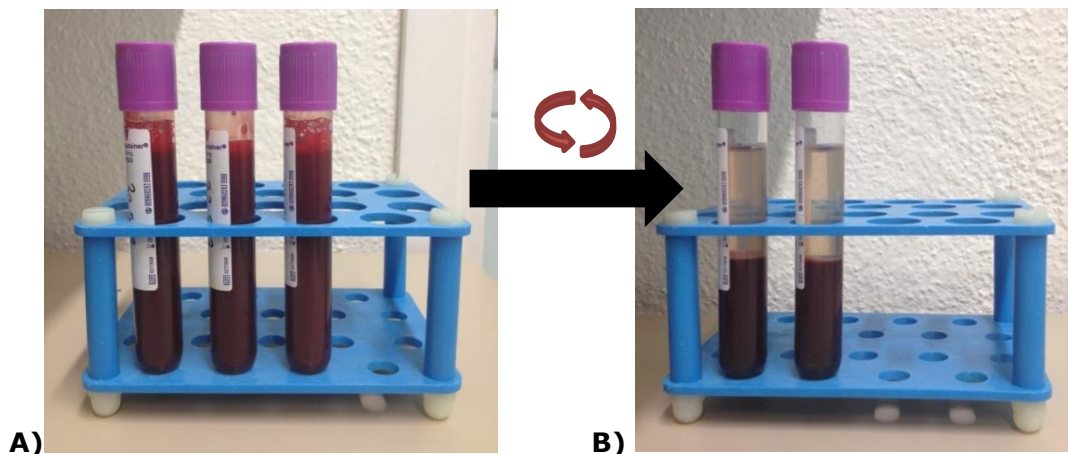


Figura 9.11. A) Tub de citrat contenint sang perifèrica de l'ovella gestant; B) Tub amb sang perifèrica d'ovella centrifugada. S'observa la presència de la fase eritrocitària a la part inferior, la fase leucocitària (Buffy Coat) a la posició intermitja i, a la part superior, el plasma.

9.12.2. PREPARACIÓ DEL CONSTRUCTE AMB AF-oMSCS

Les AF-oMSCs procedents dels cultius d'expansió (si s'escau, marcades amb MPIOs) es concentren per centrifugació a 500 g durant 10 minuts. Es retira el sobrenedant, les AF-oMSCs es resuspenen amb 1 mL de PPP i es dispensen en un pouet de 3.8 cm² d'una placa de 12 pous (Corning). S'afegeixen 50 µL de CaCl₂ al 10% grau clínic (B. Braun Biomedical S.A.), s'homogeneïtza i s'incuba durant 5-10 minuts a 37°C. Passat aquest temps, es comprova que s'ha format el coàgul i s'afegeixen 2 mL de medi basal al pou. D'aquesta manera, les cèl·lules es mantenen alimentades fins a la seva implantació en l'animal, l'endemà a les 12-16h de la preparació del constructe (veure apartat 9.14. *Cirurgia de Reparació del MMC*).

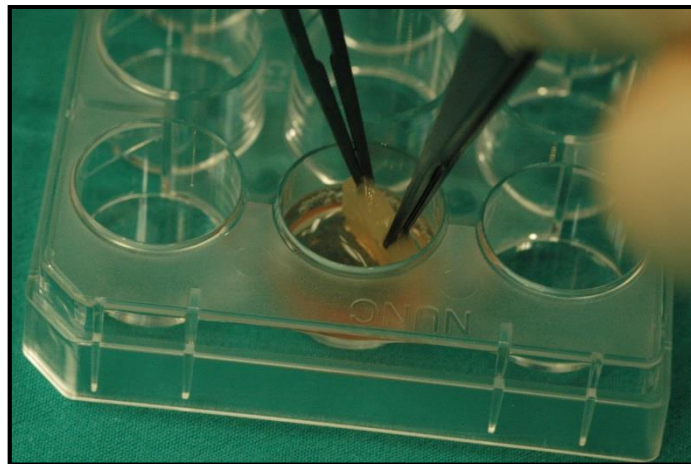


Figura 9.12. Aspecte macroscòpic del constructe de Fibrina en el moment de ser utilitzat per a la reparació del MMC.

9.12.3. ESTUDI D'ESTABILITAT DE LES AF-oMSCS EN FIBRINA

Es porten a terme estudis qualitius per tal de comprovar l'estabilitat de les AF-oMSCs en el constructe de fibrina. L'objectiu és assegurar-nos que quan s'aministren les cèl·lules a l'animal, l'endemà de la preparació del constructe, aquestes es mantenen vives i funcionals.

9.12.3.1. Microscòpia confocal

Es preparen quatre constructes amb diferent quantitat de AF-oMSCs, i s'afegeix medi basal per alimentar a les cèl·lules que es recanvia cada 2-4 dies. Els constructes es mantenen durant un màxim de 8 dies a 37°C, 5 % de CO₂ i 90% d'humitat relativa. Durant aquest temps, es comprova per microscòpia confocal si hi ha canvis en la morfologia cel·lular i si les cèl·lules es multipliquen en el constructe.

Constructe	Línia Cel·lular	Passi	Quantitat AF-oMSCs	Volum coàgul (mL)	Superfície pou (cm ²)	Temps seguiment
1	F101P	P2	1,3 x10 ⁵	4	9,5	8 dies
2	F101P	P1	1,7 x10 ⁴	1	3,8	8 dies
3	F109P	P2	1,0 x10 ⁶	1	3,8	24 hores
4	F109P	P1	4,0 x10 ⁶	1	3,8	24 hores

Taula 9.7. Resum de la informació relativa als coàguls de Fibrina preparats per estudiar el comportament de les AF-oMSCs en el seu interior mitjançant microscòpia confocal (línia cel·lular i passi; dosi AF-oMSCs, volum del coàgul, superfície utilitzada i temps de seguiment).

9.12.3.2. Microscòpia de Fluorescència

De forma complementària es repeteix l'estudi, aquesta vegada per fer un seguiment mitjançant microscòpia de fluorescència. En el cas de les AF-oMSCs destinades al constructes amb fibrina, el marcatge cel·lular es porta a terme previ a la formació del coàgul.

A) Protocol de marcatge de les AF-oMSCs amb Vibrant DyeCycle Violet i PKH26:

- Es parteix de 10 mL de suspensió cel·lular de la línia AF 2729 P1 contenint $2,5 \times 10^6$ AF-oMSCs vives.
- Es centrifuga durant 10 minuts a 500 g, s'elimina el sobrenedant i el pellet cel·lular es resuspen amb 2 mL de M199 (sense suplementar).
- S'afegeix a la suspensió 3 μ L de PKH26 diluït en 1 mL de Diluent C i s'incuba durant 5 minuts a TA i foscor.
- A continuació, s'inactiva el colorant amb 3 mL de FBS BI 315495 i seguidament s'addiciona 6 μ L de Vibrant DyeCycle Violet (per aconseguir una concentració final de 5 μ M).
- S'incuba a 37°C durant 30 minuts, homogeneïtzant la solució aproximadament cada 10 minuts.
- Passat aquest temps, la solució es centrifuga i el pellet cel·lular es resuspen amb 3 mL de PPP 2729 + 150 μ L de CaCl₂ al 10% i es dispensa en placa de vidre (MatTek Corporation).
- Finalment, s'incuba a 37°C durant 5 minuts i, un cop format el coàgul, s'afegeixen 3 mL de medi basal.

B) Protocol de marcatge de les AF-oMSCs amb DAPI i PKH26:

Aquest protocol s'aplica a les suspensions cel·lulars de la línia AF 107 P1 i AF 29 P2 (Figura 9.13):

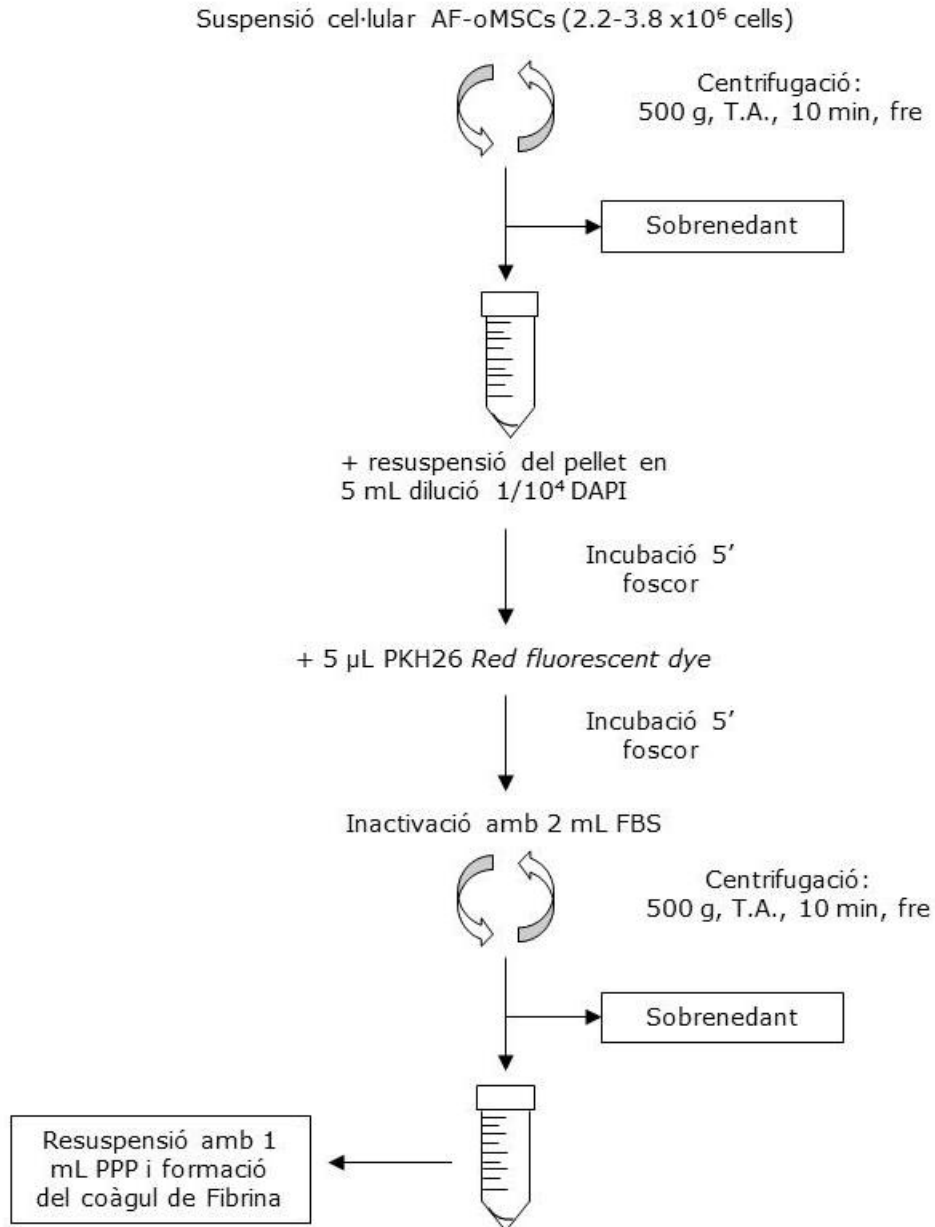


Figura 9.13. Esquema del protocol de marcatge de les AF-oMSCs amb DAPI i PKH26.

9.13. PREPARACIÓ DELS CONSTRUCTES AMB MÀTRIU ÒSSIA DESMINERALITZADA I FIBRINA

Per a la preparació d'aquest tipus de constructes, s'utilitza matriu òssia desmineralitzada (BonusTM DBM; BIOMET Biologics, Inc), liofilitzada i amb estructura porosa.



Figura 9.14. Imatge de la biomatriu òssia desmineralitzada en format de 10 mL dins una xeringa, i en aquest cas impregnada amb moll d'os.

El format comercial és en forma de cilindre dins una xeringa de volum nominal 10 mL. Per aquest motiu, i prèviament al seu ús, es fracciona en làmines d'aproximadament 1-2 mm de gruix mitjançant bisturí amb mànec estèril (B. Braun Biomedical S.A.) sobre un camp estèril. Les fraccions es conserven individualment dins un tub falcon de fons pla de 30 mL (Sarstedt) i s'emmagatzemen a temperatura ambient.

En el moment de la preparació del constructe, el DBM es trosseja mitjançant un bisturí amb mànec estèril i es pesa (Balança analítica OHAUS, Model Adventurer Pro).

A continuació, el DBM trossejat es disposa en un pouet d'una placa de 12 pous (3.8 cm²), i es repeteix la pesada del tub falcon que contenia el material. La diferència entre els dos valors de les pesades permet conèixer la quantitat real de DBM utilitzat (g) per fabricar el constructe.

Seguidament, s'afegeix sobre la matriu òssia 1 mL de suspensió amb la dosi desitjada d'AF-oMSCs en PPP i es deixa en repòs uns minuts fins que s'observa que el DBM s'ha hidratat i perd l'estructura rígida. A continuació, s'afegeixen 50 µL de CaCl₂ al 10% grau clínic (B. Braun Biomedical S.A.) i s'incuba durant 5 minuts a 37°C. Transcorregut aquest temps, es comprova que s'ha format el coàgul (Figura 9.14.) i s'afegeixen 2 mL de medi basal al pou, per tal d'alimentar les cèl·lules en les següents hores.

Adicionalment, es prepara un coàgul de fibrina (sense AF-oMSCs) que s'utilitzarà també durant la reparació del MMC, tal com es detalla en l'apartat 9.14. *Cirurgia de Reparació del MMC.*

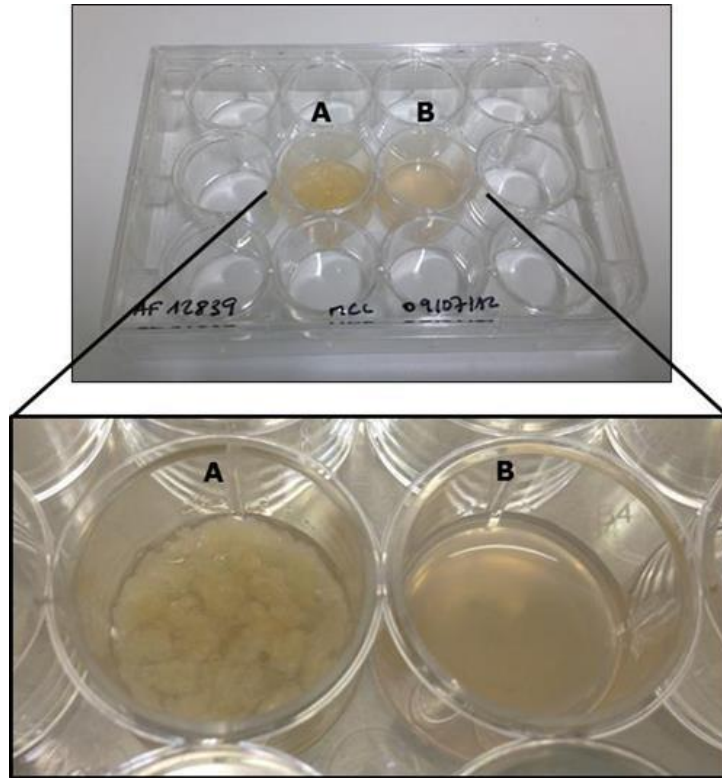


Figura 9.14. Aspecte macroscòpic del constructe amb AF-oMSCs, DBM i fibrina (A) i de Fibrina (B).

Per als estudis d'estabilitat de les AF-oMSCs en aquest tipus de constructe, es repeteix el mateix protocol de marcatge que s'ha utilitzat per a la fibrina i, en aquest cas, s'afegeix el DBM previ a la formació del coàgul.

9.14. CIRURGIA DE REPARACIÓ DEL MMC

La cirurgia de reparació del MMC es porta a terme a un total de 34 ovelles al dia 96 (79-110) de gestació, de les quals 7 corresponen a la reparació amb el constructe de PLGA, 8 a la reparació amb Fibrina i 19 es reparen a DBM i Fibrina.

9.14.1. EXPOSICIÓ DE LA ZONA AMB MMC

En primer lloc, l'ovella gestant es pesa (SW300, Digi-Star LLC) per comprovar un augment de pes indicatiu de progressió de la gestació.

A continuació es prepara l'animal per la cirurgia, seguint el mateix protocol descrit en l'apartat 9.1. *Cirurgia d'inducció del MMC*. Un cop l'ovella està anestesiada i s'ha preparat el camp quirúrgic, es procedeix a laparotomia mitja amb una incisió paral·lela a la cicatriu de la cirurgia prèvia. S'identifica l'úter gràvid per palpació i s'exterioritza fora de la cavitat abdomino-pèlvica. Si hi ha adherències amb l'epipló, aquestes s'han d'alliberar amb molta cura. Per palpació s'identifica la posició del

fetus i es defineix el punt d'obertura de la paret uterina que cal que sigui d'escassa vascularització i que estigui a sobre de la zona lumbar fetal.

La paret uterina s'obre com a la primera cirurgia i, com que en aquest estadi l'animal és molt més gran, no s'exterioritza la part posterior, sinó que únicament s'exposa la zona lumbar (Figura 9.15.A.).

9.14.2. REPARACIÓ DEL MMC

Un cop visualitzada la zona lumbar, es comprova la situació del defecte i es desenganxa la pell de la perifèria de la lesió.

En la reparació amb constructes de PLGA o de fibrina, el constructe es col·loca sobre el defecte cobrint-lo en la seva totalitat i, per sobre d'aquest, la pell artificial Matriderm® (MedSkin Solutions Dr. Suwelack AG) introduint-la per sota de la pell de la perifèria de la lesió i així aconseguir una estabilitat primària dels implants. En aquest moment, s'aplica l'adhesiu COSEAL® (Baxter) per segellar tota l'àrea.

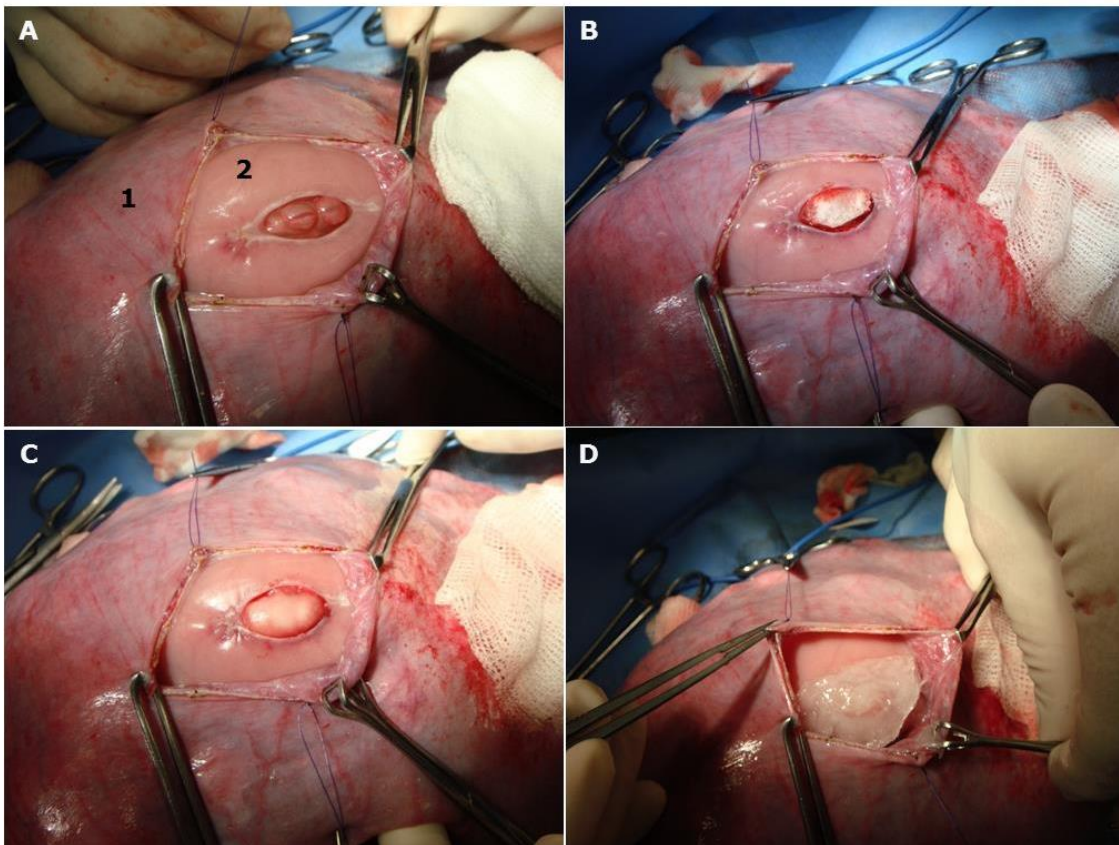


Figura 9.15. Reparació del MMC de l'ovella 101 amb biomatriu de PLGA: A) Exposició del MMC, B) Disposició de la biomatriu de PLGA sobre el defecte i C) Cobertura amb el substitut de pell Matriderm® (els implants queden enterrat perifèricament per la pell); D) Segellat amb COSEAL®; 1) Paret uterina i 2) Part posterior del fetus oví.

En la reparació amb constructes de DBM i fibrina, s'utilitza una variant de la tècnica anterior. Amb l'objectiu de regenerar l'arc ossi de les tres vèrtebres en què es va extreure, en primer lloc es refresquen els monyons ossis d'amputació ressecant la part fibrosa que els cicatritza en superfície. Seguidament el constructe es talla fent tres làmines longitudinals que es col·loquen al defecte com si fossin els tres arcs vertebrals, cada làmina amb DBM, fibrina i AF-oMSCs en contacte amb els monyons ossis corresponents. Entremig es col·loca una làmina de fibrina sense DBM ni cèl·lules, per fer de separació. Tot el sistema es cobreix amb la pell artificial Matriderm[®] que s'introdueix també per sota de la pell pròpia de la perifèria de la lesió i es segella amb l'adhesiu sintètic COSEAL[®].

Un cop el mielomeningocele està reparat, s'omple la cavitat uterina amb Ringer Lactat i antibiòtic i es tanca la paret uterina com a la primera cirurgia fetal. A continuació s'introdueix l'úter a la seva posició i es tanca la paret abdominal.

Finalment, es fa el seguiment postoperatori de la mateixa manera que després de la primera cirurgia.

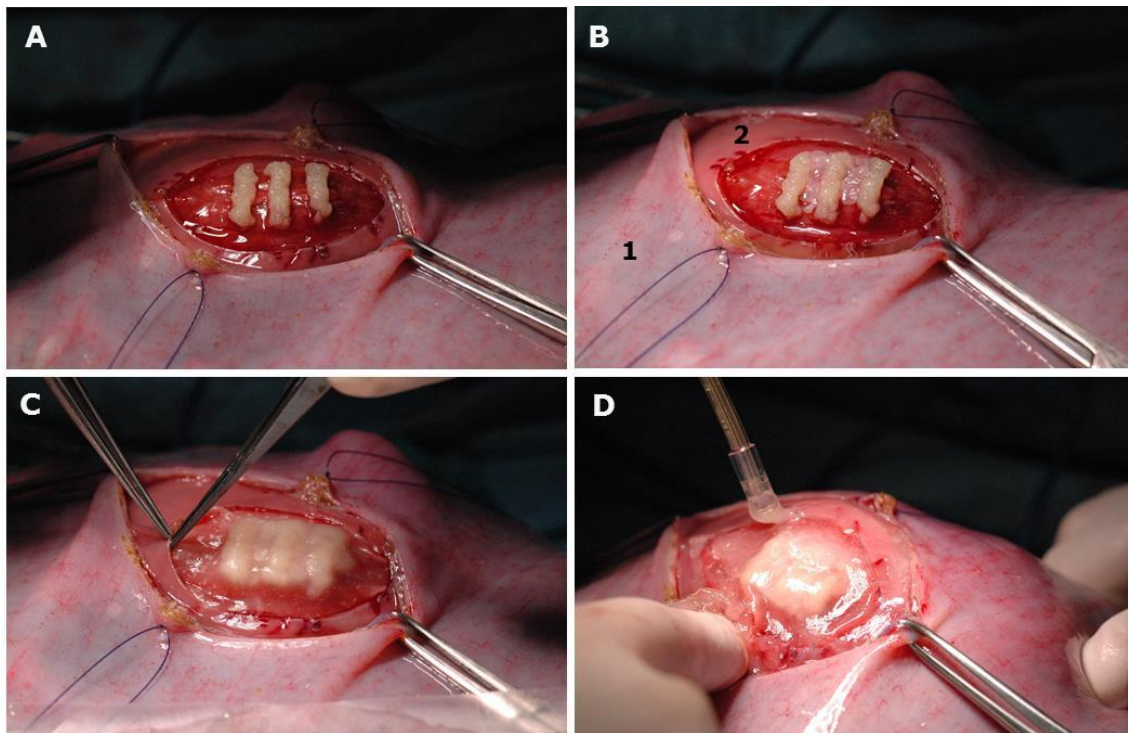


Figura 9.16. Reparació del MMC de l'ovella 12698 amb biomatriu de DBM i Fibrina: Disposició de tres làmines longitudinals de DBM sobre el defecte seguint els monyons ossis (A) i, entremig, es col·loquen làmines de fibrina (B); es cobreix amb el substitut de pell Matriderm[®] (C) de manera que els implants quedin enterrat perifèricament per la pell i finalment es segella amb COSEAL[®] (D); 1) Paret uterina i 2) Part posterior del Fetus Oví.

9.15. RECUPERACIÓ I SEGUIMENT DELS NOUNATS OVINS

9.15.1. RECUPERACIÓ DEL NOUNAT OVÍ

Es programa una cesària electiva abans de final de la gestació, entre els 135 i 145 dies, per tal d'evitar que l'ovella pugui parir en un moment en què no es pugui cuidar del nounat (nits o en caps de setmana).

En aquest procediment hi participen dos equips formats, cadascun d'ells, per un veterinari i un metge. El primer equip es fa càrrec de la mare i el segon del nounat oví.

La preparació de l'ovella gestant no difereix de les cirurgies prèvies. Un cop anestesiada es procedeix a cesària per laparotomia mitja i obertura àmplia de la paret uterina. El moment de la cesària és molt crític pel nounat, ja que es tracta d'animals que han sofert dues cirurgies fetals i presenten una lesió neurològica. Així doncs, el procediment es fa molt ràpid per evitar que el fetus estigui deprimat.

Un cop el nounat s'ha extret, s'asseca, se li aspiren les secrecions i s'estimula perquè respiri espontàniament. En cas d'estar molt deprimat per l'anestèsia, es pot intubar. Aquests animals solen ser més petits i tenen menys vitalitat que els nounats sans. A vegades necessiten col·locació de via venosa i administració de seroteràpia amb glucosa. A continuació, es col·loca a la incubadora i se li administra calostre a través d'un biberó. Per altra banda, es procedeix a eutanàsia de la mare.

En cas que la gestació sigui doble, l'equip de la mare passa a fer-se càrrec del nounat sa un cop s'ha dut a terme l'eutanàsia de l'ovella gestant.

9.15.2. ESTUDI CLÍNIC DEL NOUNAT OVÍ

Quan el nounat està estabilitzat, es procedeix al seu estudi. Es valora macroscòpicament la zona del defecte per comprovar el grau de tancament o cicatrització i si perd líquid cefaloraquídi. Així mateix, s'avalua si existeixen deformitats a la columna lumbar o a les extremitats posteriors.

També es fa una valoració neurològica funcional en què s'estudia la capacitat de mantenir-se dret, capacitat de marxa, presència d'atàxia de les extremitats anteriors, capacitat de deglució, reflexes osteo-tendinosos profunds, reflex anal, reflex de retirada per pessigada al peu, incontinença urinària i fecal.

En els casos en què el nounat presenta bona vitalitat, es manté amb vida 24 hores i se li practica una electromiografia amb potencials evocats al Servei de Neurologia

Veterinària de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona (Dra. Sonia Añor).

9.15.3. ESTUDI POSTCLÍNIC DEL NOUNAT OVÍ

Un cop fet l'estudi clínic es procedeix a la eutanàsia de l'animal per injecció de pentobarbital (200 mg/kg). Després es canalitza l'artèria caròtida i s'introdueix formaldehid per tal de fixar els teixits, especialment el cervell.

Es secciona el coll per la tercera o quarta vèrtebra cervical i es guarda en un recipient amb formaldehid. Es secciona la zona del defecte agafant una vèrtebra cranial i una altra caudal sanes i es guarda en un segon recipient amb formaldehid.

La peça del cap es talla sagitalment i es conserva per a estudis que pugui interessar dur a terme en un futur com ara comprovar i mesurar la possible malformació de Chiari.

La peça del defecte lumbar reparat es processa al cap de 24-48 hores al servei d'anatomia patològica. Es tallen amb molta cura els segments vertebrals individuals de cada una de les vèrtebres operades. En cas que s'hagin de fer estudis de RMN, en aquest moment es pren una de les vèrtebres reparades que es manté en formaldehid fins al moment de l'anàlisi. Les vèrtebres restants es col·loquen en recipients individuals amb líquid descalcificant ràpid (Casa Álvarez) identificant l'animal i la vèrtebra. Transcorregudes entre 12 i 48 hores (segons la mida i el gruix de la vèrtebra) es procedeix al seu processament amb parafina i a fan talls de 4 µm de gruix.

9.15.4. CRITERIS DE PUNT FINAL

Els criteris de punt final aplicats a les ovelles gestants que han participat en aquest estudi i aprovats pel CEEA local són:

1. Avortament.
2. Procés sèptic sense resposta a desbridament quirúrgic i teràpia amb antibiòtic.
3. Shock hipovolèmic sense resposta a mesures de reposició.

9.16. ESTUDIS HISTOLÒGICS

Aquests estudis es fan al Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital Vall d'Hebron (Dra. Cleofe Romagosa) i a la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona (Dra. Rosa Rabanal). Seguidament es detallen els protocols utilitzats:

9.16.1. TINCIONS HISTOLÒGIQUES

9.16.1.1. Tècniques fetes al Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital Vall d'Hebron:

A) Tinció Hematoxilina-Eosina

Es fa aquesta tinció histològica mitjançant l'aplicació d'un conjunt de colorants com són: A) l'hematoxilina que, per ser catiònica o bàsica, tenyeix estructures àcides (basòfiles) amb tons blau, com per exemple els nuclis cel·lulars i B) l'eosina que, per la seva naturalesa aniònica o àcida, tenyeix components bàsics (acidòfils) en tons de color rosa, com per exemple el citoplasma.

Solucions:

- Xilol PQA (Química Clínica Aplicada S.A.)
- Etanol (Merck)
- Hematoxylin en solució Harris (Merck)
- Eucalyptol (USP; Panreac)
- Àcid Clorhídric (HCl; Panreac)
- Aigua Amoniacal (Sigma-Aldrich)

Desparafinat de les mostres:

1. Xilol durant 2 minuts.
2. Xilol durant 2 minuts.
3. Etanol Absolut durant 2 minuts.
4. Etanol Absolut durant 1 minut.
5. Etanol 95° durant 1 minut.
6. Etanol 95° durant 1 minut.
7. H₂O Destil·lada 1 minut.

Tinció amb Hematoxilina:

1. Submergir les mostres tres vegades en Hematoxilina durant 2 min 25 segons cada vegada.
2. Rentar amb aigua corrent durant 1 minut.
3. Submergir en àcid clorhídric durant 9 segons.
4. Rentar amb aigua destil·lada durant 30 segons.
5. Rentar amb aigua Amoniacal durant 1 minut.
6. Rentar amb aigua corrent durant 1 minut.

Contratinció amb Eosina:

1. Tenyir amb Eosina durant 30 segons.

2. Etanol 95° 6 segons.
3. Etanol 95° 6 segons.
4. Etanol Absolut 6 segons.
5. Etanol Absolut 6 segons.
6. Xilol/eucaliptol 6 segons.
7. Xilol/eucaliptol 6 segons.
8. Muntatge de la mostra.

Les següents tres tincions del Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital Vall d'Hebron (Tinció de PERL's, Alcian Blue i Tricròmic de Masson) s'han fet mitjançant un sistema automàtic, utilitzant el mòdul de tinció ARTISAN LINK de DAKO (processador de tincions especials) i kits de reactius comercials també de Dako.

B) Tinció de PERL's

La tinció de PERL's permet detectar i identificar dipòsits de ferro en mostres parafinades. El ferro reacciona amb el Ferrocianur potàssic per formar Ferrocianur fèrric que és insoluble, de color blau i es coneix amb el nom de Prussian Blue.

1. Desparafinar i hidratar.
2. Preparar Solució de Ferro amb ferrocianur potàssic al 2% i àcid clorhídric al 2%, fent una dilució a parts iguals. Incubar durant 30 minuts.
3. Rentar amb aigua destil·lada.
4. Incubar amb Kernechtrot (Nuclear Fast Red) durant 3 minuts.
5. Rentar amb aigua destil·lada.
6. Deshidratar i muntar.

Interpretació de la tinció:

- Ferro fèrric: Blau.
- Nuclis: vermell.
- Fons: rosa.

C) Tinció Alcian Blue

Aquesta tinció serveix per detectar glicosaminoglicans (GAGs) o mucopolisacàrids àcids en talls parafinats de teixits fixats en formol. La presència de coloració blava en el micromass pellet indica la síntesi de proteoglicans per part de les AF-oMSCs durant la diferenciació condrogènica *in vitro*.

1. Desparafinar i hidratar.
2. Incubar durant 3 minuts amb Àcid acètic al 3%.
3. Comprovar que el pH del colorant Alcian Blue estigui entre 2.3 i 2.6.

4. Incubar durant 30 minuts amb Alcian Blue.
5. Rentar amb aigua corrent durant 10 minuts.
6. Rentar amb aigua destil·lada.
7. Tenyir durant 3 minuts amb Kernechtrot.
8. Rentar amb aigua destil·lada.
9. Deshidratar i muntar.

Interpretació de la tinció:

- Mucopolisacàrids àcids dèbilment sulfatats, sulfomucines, àcid hialurònic, sialomucines: blau fosc.
- Nuclis: de vermell a rosa.
- Citoplasma: rosa pàl·lid.

D) Tricròmic de Masson

Aquesta tinció està dissenyada per identificar les fibres de col·lagen del teixit connectiu. Es segueix el següent protocol:

1. Desparafinar i hidratar.
2. Incubar amb Bouin durant 1 hora a 56 °C.
3. Rentar amb aigua corrent fins que el color groc desapareix.
4. Rentar amb aigua destil·lada.
5. Incubar amb Hematoxilina de Weigert durant 13 minuts.
6. Rentar amb aigua corrent 5 minuts.
7. Rentar amb aigua destil·lada.
8. Incubar amb solució de tricròmic verd de Gomori durant 30 minuts.
9. Decolorar amb àcid acètic al 0.5% durant 15 segons.
10. Rentar amb aigua destil·lada.
11. Incubar amb solució verd llum 10 minuts.
12. Rentar amb aigua destil·lada.
13. Deshidratar i muntar.

Interpretació de la tinció:

- Citoplasma: vermell.
- Fibrina: rosa .
- Col·lagen: verd.
- Nuclis: blau o negre.
- Múscul i Eritròcits: vermell

9.16.1.2. Tècniques fetes a la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona:

A) Tinció Hematoxilina-Eosina

1. Preparació de la solució mare d'Eosina Y:
 - 5 g Eosina Y.
 - 250 mL d'Aigua destil·lada.
2. Preparació de la solució mare de Floxina B:
 - 5 g de Floxina B.
 - 250 mL d'Aigua destil·lada.
3. Preparació de solució de treball (per un volum = 200 mL)
 - 22.4 mL de Solució mare d'Eosina.
 - 2.4 mL de Solució mare de Floxina.
 - 174.4 mL d'etanol 96°.
 - 1 mL d'àcid acètic glacial.
4. Desparafinar i hidratar:
 - Xilol 2 durant 6 minuts.
 - Etanol absolut durant 3 minuts.
 - Etanol 96° durant 3 minuts.
 - Etanol 70° durant 3 minuts.
 - Etanol 50° durant 3 minuts.
 - Agua corrent durant 5 minuts.
5. Tenyir amb Hematoxilina de Mayer (Mayer's hemalum solution, MERCK) durant 4 minuts.
6. Rentar amb aigua corrent 18 minuts.
7. Tenyir amb Eosina durant 2 minuts.
8. Rentar amb aigua corrent 5 minuts
9. Deshidratar:
 - Etanol 96°: 2 x 1 minut 30 segons.
 - Etanol 100°: 2 x 3 minuts.
10. Aclarar amb Xilol (3x 5 minuts) i montar en DPX.

B) Tricròmic de Masson

Preparació de les solucions:

Solució de Bouin (Fixador):

- 750 mL Solució aquosa saturada d'àcid pícric (al 1-2 % en H₂O destil·lada).
- 250 mL Formalina concentrada.
- 50 mL Àcid acètic glacial.

Un cop preparada la solució, comprovar que el pH aproximat sigui de pH 2,2.

Solució d'hematoxilina fèrrica de Biebrich-fucsina àcida:

a) Solució I

- 1 gram d'Hematoxilina cristal·litzada.
- 100 mL d'Etanol 95 % .

b) Solució II

- 100 mL d'H₂O destil·lada.
- Clorur fèrric anhidre: 1.50 g FeCl₃ o bé 2,48 g FeCl₃ 6 H₂O.

c) Solució de treball:

- 50 mL solució I.
- 50 mL solució II.
- 1 mL àcid clorhídric concentrat.

Solució d'escarlata de Biebrich-fucsina àcida:

- 90 mL Escarlata de Biebrich al 1% en H₂O destil·lada.
- 9 mL Fucsina àcida en solució aquosa al 1 %.
- 1 mL àcid acètic glacial.

Solució aquosa d'àcid fosfotúngtic al 5 % i solució d'àcid fosfomolíbdic:

- 5 g Àcid fosfotúngtic.
- 5 g Àcid fosfomolíbdic.
- 200 mL H₂O destil·lada.

Solució de blau d'anilina:

- 2,5 g blau d'anilina.
- 2 mL àcid acètic glacial.
- 98 mL H₂O destil·lada.

Solució diferenciadora – Solució aquosa d'àcid acètic glacial a l'1 %.

Solució de verd llum (light green) al 2 %:

- 2 g verd llum SF grogós.
- 99 mL H₂O destil·lada.
- 1 mL àcid acètic glacial.

Mètode:

1. Desparafinar i hidratar de manera habitual.

2. Es recomana fer un mordentatge previ amb líquid de Bouin durant 1 hora a 56-60° (o tota la nit a temperatura ambient) al material fixat en solucions de formaldehid o alcohòliques (Dicromat potàssic – 30 minuts).
3. Refredar i rentar amb aigua destil·lada fins que desaparegui el color grogós.
4. Tenyir amb hematoxilina fèrrica durant 10 minuts.
5. Rentar amb aigua destil·lada.
6. Tenyir amb la solució escalata-fucsina àcida durant 2-5 minuts.
7. Rentar amb aigua destil·lada.
8. Tractament:
 - a. Solució d'àcid fosfomolibdic-fosfotúngstic si es vol tenyir amb blau d'anilina 15 minuts. O bé,
 - b. Solució aquosa d'àcid fosfotúngstic al 5 % durant 5 minuts, si es vol tenyir amb verd llum
9. Tinció:
 - a. Blau d'anilina: 15 minuts.
 - b. Verd llum: 5 minuts.
10. Rentar amb aigua destil·lada.
11. Diferenciar en la solució d'àcid acètic al 1% durant 3-5 minuts.
12. Deshidratar, esbandir y muntar.
 - Etanol 96°: ràpid x2.
 - Etanol 100°: 5 minuts x2.
 - Xilol: 5 minuts x2.

Interpretació de la tinció:

- Fibres de col·lagen: blau.
- Teixit muscular, eritròcits i queratina: vermell
- Nuclis: lila-marró.

C) Safranina O

Aquesta tècnica permet la tinció de cartílag, mucines i mastòcits en mostres parafinades.

Preparació de les solucions:

• Solució d'hematoxilina de Weighert:

Solució A:

- 1 g d'Hematoxilina (Merk).
- 100 mL d'etanol 96°.

Solució B:

- 100 mL d'H₂O destil·lada.

- 2,48 g FeCl₃ 6 H₂O (Panreac).
- 1 mL d'HCl concentrat.

Solució de treball: solució A i B a parts iguals.

- **Fast Green FCF 0.01% en H₂O destil·lada:**

- 0.1 g Fast Green FCF (Fluka).
- 1000 mL H₂O destil·lada.

- **Safranina O 0.1% en H₂O destil·lada:**

- 0.1 g Safranina O (Fluka).
- 1000 mL H₂O destil·lada.

Mètode:

1. Desparafinar i hidratar.
2. Tenyir amb Hematoxilina de Weighert durant 10 minuts.
3. Rentar amb aigua corrent durant 10 minuts.
4. Tenyir amb Fast Green al 0.01% durant 5 minuts.
5. Submergir en Àcid acètic 1% durant 3 segons.
6. Tenyir amb Safranina O al 0.01% durant 10 minuts.
7. Deshidratació, acondicionament i muntatge (DAM):
 - Etanol 96°: ràpid x 10.
 - Etanol absolut: ràpid x 10 o 2x 5 minuts.
 - Xilè: ràpid x 10 o 2x 5 minuts.

Interpretació de resultats:

- Nucli: negre.
- Citoplasma (background): verd-gris.
- Cartíleg, mastòcits i mucines: de vermell a carbassa.

9.16.2. TÈCNiques D'IMMUNOHISTOQUÍMICA

S'apliquen aquestes tècniques d'immunohistoquímica (IHQ) en mostres d'ovella incloses en parafina per detectar:

9.16.2.1. Desmina

La IHQ es duu a terme de manera automatitzada utilitzant el mòdul de tinció Benchmark XT i el kit *ultraView* Universal DAB Detection de Ventana Medical Systems. *UltraView* Universal DAB Detection es basa en un sistema indirecte sense biotina, per detectar IgG, IgM de ratolí i anticossos primaris de conill. El protocol és el següent: un cop tallat el teixit a 3 µm, les preparacions s'estufen aproximadament una hora a 60°C i es col·loquen al mòdul de tinció.

El desparafinat es fa de manera automàtica amb la solució EZ prepTM (10x) i es desemmascara amb Cell Conditioning 1 CC1 prèviament diluït (pH= 8). Les mostres es bloquegen amb peròxid d'hidrogen al 3%, l'anticòs primari (Desmina 1/500, 1 hora d'incubació) es localitza amb un anticòs secundari marcat amb un enzim, i el complex resultant precipita (substrat de peròxid de hidrogen i cromogen de tetrahidroclorur de 3, 3'-diaminobencidina DAB). Finalment, es fa la contra tinció amb hematoxilina, es renten les preparacions i es munten per ser visualitzades.

El múscul paravertebral present a les vèrtebres reparades s'utilitza com a control positiu en aquesta tinció.

9.16.2.2. Col·lagen I

Les fibres de col·lagen formen part de la matriu extracel·lular del teixit connectiu. El col·lagen de tipus I és el més abundant en la matriu òssia i es troba també en la pell, tendons i dentina. El protocol per la detecció del col·lagen I en les mostres d'ovella és el següent:

1. Desparafinar (xilol, etanol 100, etanol 96, etanol 70, etanol 50, aigua).
2. Inhibició de la peroxidasa endògena: 3% H₂O₂ en H₂O destil·lada, 40 minuts en moviment.
3. Rentat amb H₂O corrent 30 minuts.
4. Pretractament: tampó citrat pH 6 120°C 10 minuts + 30 minuts de refredament.
5. Passar a H₂O destil·lada.
6. Rentat amb PBS i muntatge vertical.
7. Rentats amb PBS 2x5 minuts.
8. Bloqueig de les unions inespecífiques: 30% SNC (sèrum normal de cabra) en PBS 1h a temperatura ambient (T.A.).
9. Incubació de l'anticòs primari: 1:100 (Mouse monoclonal Antibody to Collagen type I ABCAM, ab6308) en PBS + 10% SNC overnight a 4°C + 30 minuts a T.A.
10. Rentats amb PBS 3x5 minuts.
11. Incubació Kit En Vision anti Mouse (Dako, K 4007) 40 minuts a T.A.
12. Rentats amb PBS 3x5 minuts.
13. Revelat de l'activitat peroxidasa: Kit En Vision (Dako, K 4007) 10 minuts a T.A.
14. Rentat amb H₂O destil·lada.
15. Rentat amb H₂O corrent 10 minuts.
16. Contrast amb Hematoxilina de Mayer 3 segons.
17. Rentat amb H₂O corrent 10 minuts.
18. Deshidratació i muntatge amb medi DPX.

Per a aquesta tinció, s'utilitza com a control positiu una mostra de dermis.

9.16.2.3. Col·lagen II

El col·lagen II és una proteïna característica del cartílag hialí i pericondri. El protocol seguit per detectar la presència de col·lagen II en les mostres analitzades és el que es detalla a continuació:

1. Desparafinar i hidratar (xilol, etanol 100°, etanol 96°, etanol 70°, etanol 50°, aigua).
2. Inhibició de la peroxidasa endògena: 3% H₂O₂ en H₂O destil·lada, 40 minuts en moviment.
3. Rentat amb H₂O corrent 30 minuts.
4. Pretractament: Pepsina 0.1% en HCl 0.01N, 20 minuts a T.A.
5. Passar a H₂O destil·lada.
6. Rentat amb PBS i muntatge vertical.
7. Rentats amb PBS 2x5 minuts.
8. Rentats amb tampó de rentat amb tritó (Phosphate-buffered saline + Tritó; PBST) 2x5 minuts.
9. Bloqueig de les unions inespecífiques: 30% HNS (Horse serum H-0146, Sigma) en PBST 1 hora a T.A.
10. Incubació de l'anticòs primari: 1:100 (Mouse anti-chicken AntiCollagen type II, Chemicon, MAB 8887) en PBST + 10% HNS overnight a 4°C+30 minuts a T.A.
11. Rentats amb PBST 3x 5 minuts.
12. Incubació de l'anticòs secundari: Horse anti-mouse biotinilat 1:200 (HaMb) (BA-2000, Vector) en PBST + 10% HNS 1 hora T.A.
13. Rentats amb PBST 2x 5 minuts.
14. Rentats amb PBS 2x 5 minuts.
15. Incubació del complex ABC 1:100 en PBS 1 hora T.A.
16. Rentar PBS 3x 5 minuts.
17. Revelat de l'activitat peroxidasa: kit en vision (Dako, K 4007) 10' T.A.
18. Rentat amb H₂O destil·lada.
19. Rentat amb H₂O corrent 10 minuts.
20. Contrast amb Hematoxilina de Mayer 3 segons.
21. Rentat amb H₂O corrent 10 minuts.
22. Deshidratació i efectuar el corresponent muntatge amb DPX.

En la IHQ del col·lagen II s'utilitza com a control positiu mostres de tràquea i cartílag de creixement d'una vèrtebra sana.

9.16.2.4. Col·lagen III

El col·lagen III es troba en el teixit de granulació característic del procés de cicatrització en una zona lesionada. Per detectar-lo en les mostres de teixit oví s'ha aplicat el següent protocol:

1. Desparafinar (xilol, etanol 100, etanol 96, etanol 70, etanol 50, aigua).
2. Inhibició de la peroxidasa endògena: 3% H₂O₂ en H₂O destil·lada, 40 minuts en moviment.
3. Rentat amb H₂O destil·lada 3x 5 minuts.
4. Pretractament: tampó citrat pH 6 120°C 10 minuts + 30 minuts refredament.
5. Passar a H₂O destil·lada.
6. Rentat amb PBS i muntatge vertical.
7. Rentats amb PBS 2x5 minuts.
8. Bloqueig de les unions inespecífiques: 30% SNC (sèrum normal de cabra) en PBS 1h a T.A.
9. Incubació de l'anticòs primari: 1:100 (Rabbit policlonal Antibody to Collagen type III ABCAM, ab7778) en PBS + 10% SNC overnight a 4°C + 30 minuts a T.A.
10. Rentats amb PBS 3x 5 minuts.
11. Incubació Kit En Vision anti Rabbit (Dako, K 4011) 40 minuts a T.A.
12. Rentats amb PBS 3x 5 minuts.
13. Revelat de l'activitat peroxidasa: Kit En Vision (Dako, K 4011) 10 minuts a T.A.
14. Rentat amb H₂O destil·lada.
15. Rentat amb H₂O corrent 10 minuts.
16. Contrast amb Hematoxilina de Mayer 3 segons.
17. Rentat amb H₂O corrent 10 minuts.
18. Deshidratació i muntatge amb DPX.

En aquest cas, s'utilitza com a control positiu mostra procedent de la melsa.

9.16.2.5. Proteïna Verda Fluorescent (eGFP)

Aquesta tècnica s'utilitza per identificar les AF-oMSCs marcades amb eGFP en el teixit oví i es procedeix de la següent manera:

1. Desparafinar (xilol, etanol 100, etanol 96, etanol 70, etanol 50, aigua).
2. Inhibició de la peroxidasa endògena: 3% H₂O₂ en H₂O destil·lada, 40 minuts en moviment i fosc.
3. Rentat amb H₂O corrent 30 minuts.
4. Rentat amb PBS 3x 5 minuts i muntatge vertical.
5. Bloqueig de les unions inespecífiques: 30% SNR (sèrum normal de conill) en PBS 1h a T.A.

6. Incubació de l'Ac 1^a: Goat anti-GFP 1:500 en solució de bloqueig (PBS+10% SNR) overnight a 4°C+ 1 hora a T.A.
7. Rentats amb PBS 3x 5 minuts.
8. Incubació de l'Ac 2^a: Rabbit anti- Chicken biotinat (RaChb, Abcam) 1:200 en solució de bloqueig (PBS+10% SNR) 30 minuts a T.A.
9. Rentats amb PBS 3x 5 minuts.
10. Incubació complex ABC 1:100 en PBS 1h T.A.
11. Rentats amb PBS 3x 5 minuts.
12. Revelat de l'activitat peroxidasa: Kit En Vision (Dako, K 4007) 10 minuts T.A.
13. Rentat amb H₂O_d + H₂O_c 10'.
14. Contrast amb Hematoxilina de Mayer 3" i rentar amb H₂O_c 10' (sota aixeta).
15. DAM.

9.16.3. AVALUACIÓ DE LA REGENERACIÓ DE L'ARC VERTEBRAL POSTERIOR

L'avaluació de la neoformació d'os en la zona de reparació del MMC en els animals tractats amb constructes de DBM, fibrina i AF-oMSCs es fa mitjançant la tinció HE dels talls histològics i es quantifica per un sol equip format per dos avaluadors segons la taula que es descriu a continuació:

PUNTUACIÓ	DESCRIPCIÓ
0	No s'observa DBM.
1	Presència de DBM; No s'observa colonització d'espícules de DBM.
2	Colonització de poques espícules de DBM, no formen arc vertebral.
3	Colonització de moltes espícules de DBM, no formen arc vertebral.
4	Formació d'arc vertebral incomplet.
5	Formació d' arc vertebral complet.

Taula 9.8. Puntuació associada a la neoformació d'os en els animals reparats amb constructes de DBM, fibrina i AF-oMSCs.

9.17. ANÀLISIS ESTADÍSTICS

En general, les dades es presenten en format mediana (mínim – màxim). En alguns casos, de forma complementària, s'informa la mitjana i desviació estàndard.

Els tests estadístics s'han portat a terme fent ús del programa SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) o, en el seu defecte, el GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). El test de Mann Whitney, test no paramètric per

analitzar parells de dades no relacionades, s'aplica per comparar la quantitat d'AF-oMSCs obtingudes en l'etapa d'aïllament (per a tots els paràmetres analitzats) i per avaluar les condicions òptimes del cultiu en l'etapa d'expansió. En cas de voler comparar més de dues variables al mateix temps, com en l'anàlisi del marcatge d'AF-oMSCs amb diferents concentracions de MPIOs i el seu efecte sobre el creixement cel·lular, s'utilitza el Test Kruskal-Wallis. Les diferències es consideren significatives si el valor és de $p < 0.05$.

Per avaluar la relació lineal entre dues variables, s'utilitza el coeficient de correlació de Pearson (r Pearson).

CAPÍTOL 10: BIBLIOGRAFIA

1. Gammill LS, Bronner-Fraser M. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(10):795-805.
2. Ahmad FU, Dwarakanath S, Sharma BS, Mahapatra AK. Multiple Neural Tube Defects: A Clinical Series of Seven Cases and Their Embryological Basis. *Pediatric Neurosurgery.* 2008;44(4):280-7.
3. Loft AG. Determination of amniotic fluid acetylcholinesterase activity in the antenatal diagnosis of foetal malformations: the first ten years. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1990;28(12):893-911.
4. Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Neural-Tube Defects. *New England Journal of Medicine.* 1999;341(20):1509-19.
5. Copp AJ, Adzick NS, Chitty LS, Fletcher JM, Holmbeck GN, Shaw GM. Spina bifida. *Nature Reviews Disease Primers.* 2015:15007.
6. Wald N. Folic Acid and the Prevention of Neural Tube Defects. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1993;678(1):112-29.
7. Prevalence of rare diseases: Bibliographic data [Internet]. Orphanet Report Series. 2014.
8. Seller M. Recent developments in the understanding of the aetiology of neural tube defects. *Clinical Dysmorphology.* 1995;4(2):93-104.
9. Hutchins G, McGowan K, Blakemore K. Spinal dysraphia: not a neural tube defect? . *Am J Hum Genet* 1992;51:A319.
10. McLone D, Dias M. The Chiari II malformation: cause and impact. *Childs Nerv Syst.* 2003;19(7-8):540-50.
11. McLone D, Knepper P. The cause of Chiari II malformation: a unified theory. *Pediatr Neurosci* 1989;15(1):1-12.
12. Bruner JP, Tulipan N, Paschall RL, et al. Fetal surgery for myelomeningocele and the incidence of shunt-dependent hydrocephalus. *JAMA.* 1999;282(19):1819-25.
13. Encinas JL, García-Cabezas MÁ, Barkovich J, Fontecha CG, Peiró JL, Soto GMC, et al. Maldevelopment of the cerebral cortex in the surgically induced model of myelomeningocele: implications for fetal neurosurgery. *Journal of Pediatric Surgery.* 2011;46(4):713-22.
14. Adzick NS. Fetal myelomeningocele: Natural history, pathophysiology, and in-utero intervention. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine.* 2010;15(1):9-14.
15. Dillon CM, Davis BE, Duguay S, Seidel KD, Shurtleff DB. Longevity of Patients Born with Myelomeningocele. *Eur J Pediatr Surg.* 2000;10(S 1):33-4.
16. Bowles D, Wasiak R, Kissner M, van Nooten F, Engel S, Linder R, et al. Economic burden of neural tube defects in Germany. *Public Health.* 2014;128(3):274-81.
17. Scott Adzick N. Fetal surgery for spina bifida: Past, present, future. *Seminars in Pediatric Surgery.* 2013;22(1):10-7.
18. Housley HT, Graf JL, Lipshultz GS, Calvano CJ, Harrison MR, Farmer DL, et al. Creation of Myelomeningocele in the Fetal Rabbit. *Fetal Diagnosis and Therapy.* 2000;15(5):275-9.
19. Watanabe M, Jo J-i, Radu A, Kaneko M, Tabata Y, Flake AW. A Tissue Engineering Approach for Prenatal Closure of Myelomeningocele with Gelatin Sponges Incorporating Basic Fibroblast Growth Factor. *Tissue Engineering Part A.* 2010;16(5):1645-55.
20. Meuli M, Meuli-Simmen C, Yingling CD, Hutchins GM, Hoffman KM, Harrison MR, et al. Creation of myelomeningocele in utero: A model of functional damage from spinal cord exposure in fetal sheep. *Journal of Pediatric Surgery.* 1995;30(7):1028-33.
21. von Koch CS, Compagnone N, Hirose S, Yoder S, Harrison MR, Farmer DL. Myelomeningocele: Characterization of a surgically induced sheep model and its central nervous system similarities and differences to the human disease. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* 2005;193(4):1456-62.

22. Guilbaud L, Garabedian C, Di Rocco F, Fallet-Bianco C, Friszer S, Zerah M, et al. Limits of the surgically induced model of myelomeningocele in the fetal sheep. *Childs Nerv Syst.* 2014;30(8):1425-9.
23. Watanabe M, Kim AG, Flake AW. Tissue Engineering Strategies for Fetal Myelomeningocele Repair in Animal Models. *Fetal Diagnosis and Therapy.* 2015;37(3):197-205.
24. Joaquim L. Reis, Jorge Correia-Pinto, Mariana P. Monteiro, Grover M. Hutchins. In utero topographic analysis of astrocytes and neuronal cells in the spinal cord of mutant mice with myelomeningocele. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics.* 2007;106(6):472-9.
25. Bouchard S, Davey MG, Rintoul NE, Walsh DS, Rorke LB, Adzick NS. Correction of hindbrain herniation and anatomy of the vermis after in utero repair of myelomeningocele in sheep. *Journal of pediatric surgery.* 2003;38(3):451-8.
26. Paek BW, Farmer DL, Wilkinson CC, Albanese CT, Peacock W, Harrison MR, et al. Hindbrain herniation develops in surgically created myelomeningocele but is absent after repair in fetal lambs. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* 2000;183(5):1119-23.
27. Fontecha C, Peiró J, Aguirre M, Soldado F, Paz P, Oria M, et al. The effect of prenatal treatment with steroids and preterm delivery in a model of myelomeningocele on the rabbit foetus. *Pediatr Surg Int.* 2007;23(5):425-9.
28. Meuli M, Moehrlen U. Fetal surgery for myelomeningocele is effective: a critical look at the whys. *Pediatr Surg Int.* 2014;30(7):689-97.
29. Johnson MP, Sutton LN, Rintoul N, Crombleholme TM, Flake AW, Howell LJ, et al. Fetal myelomeningocele repair: short-term clinical outcomes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* 2003;189(2):482-7.
30. Adzick NS, Thom EA, Spong CY, Brock JW, Burrows PK, Johnson MP, et al. A Randomized Trial of Prenatal versus Postnatal Repair of Myelomeningocele. *New England Journal of Medicine.* 2011;364(11):993-1004.
31. Güler B, Kertmen H, Akturk U, Kalan M, Sekerci Z. Use of the bovine pericardial patch and fibrin sealant in meningomyelocele closure. *Acta Neurochir.* 2014;156(7):1345-50.
32. Farmer D, Von Koch CS, Peacock WJ, et al. In utero repair of myelomeningocele: Experimental pathophysiology, initial clinical experience, and outcomes. *Archives of Surgery.* 2003;138(8):872-8.
33. Barini R, Barreto MWG, Cursino K, Zambelli H, Prando A, Sbragia L. Abruptio Placentae during Fetal Myelomeningocele Repair. *Fetal Diagnosis and Therapy.* 2006;21(1):115-7.
34. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature.* 2014;505(7483):327-34.
35. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas.* 12th ed: McGraw Hill Medical; 2010.
36. Gartner LP, Hiatt JL. *Texto Atlas de Histologia.* 2nd ed: McGraw Hill Interamericana; 2001.
37. Rouvière H, Delmas A. *Anatomia Humana Descriptiva, Topogràfica y Funcional.* 9th ed: Masson; 1987.
38. Skórzewska A, Grzymisławska M, Bruska M, Łupicka J, Woźniak W. Ossification of the vertebral column in human fetuses: histological and computed tomography studies *Folia Morphologica.* 2013;72(3):230-8.
39. Lanza R, Langer R, Vacanti J. *Principles of Tissue Engineering.* 3rd ed. New York, NT, USA 2007.
40. Lammers G, Verhaegen PDHM, Ulrich MMW, Schalkwijk J, Middelkoop E, Weiland D, et al. An Overview of Methods for the In Vivo Evaluation of Tissue-Engineered Skin Constructs. *Tissue Engineering Part B: Reviews.* 2011;17(1):33-55.
41. Nakamura N, Miyama T, Engebretsen L, Yoshikawa H, Shino K. Cell-Based Therapy in Articular Cartilage Lesions of the Knee. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related*

- surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association. 2009;25(5):531-52.
42. Schussler O, Chachques JC, Mesana TG, Suuronen EJ, Lecarpentier Y, Ruel M. 3-Dimensional Structures to Enhance Cell Therapy and Engineer Contractile Tissue. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. February 1, 2010;18(2):188-98.
43. Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, Markert CD, Andersson K-E, Atala A, et al. Characterization of Urine-Derived Stem Cells Obtained from Upper Urinary Tract for Use in Cell-Based Urological Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A*. 2011.
44. Schrader S, Notara M, Beaconsfield M, Tuft SJ, Daniels JT, Geerling G. Tissue Engineering for Conjunctival Reconstruction: Established Methods and Future Outlooks. *Current Eye Research*. 2009;34(11):913-24.
45. Terenghi G, Wiberg M, Kingham PJ, Stefano G, Pierluigi Tos and Bruno B. Chapter 21 Use of Stem Cells for Improving Nerve Regeneration. *International Review of Neurobiology*. Volume 87: Academic Press; 2009. p. 393-403.
46. Chen F-M, Jin Y. Periodontal Tissue Engineering and Regeneration: Current Approaches and Expanding Opportunities. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2010;16(2):219-55.
47. Sah RL, Ratcliffe A. Translational Models for Musculoskeletal Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2010;16(1):1-3.
48. Jones E, Yang X. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: Current status. *Injury*. 2011;In Press, Corrected Proof.
49. Eggink AJ, Roelofs LA, Feitz WF, Wijnen RM, Lammens MM, Mullaart RA, et al. Delayed intrauterine repair of an experimental spina bifida with a collagen biomatrix. *Pediatr Neurosurg*. 2008;44(1):29-35.
50. Fauza DO, Jennings RW, Teng YD, Snyder EY. Neural stem cell delivery to the spinal cord in an ovine model of fetal surgery for spina bifida. *Surgery*. 2008;144(3):367-73.
51. Watanabe M, Li H, Roybal JL, Santore MT, Radu A, Jo J-i, et al. A Tissue Engineering Approach for Prenatal Closure of Myelomeningocele: Comparison Of Gelatin Sponge And Microsphere Scaffolds And Bioactive Protein Coatings. *Tissue Engineering Part A*. 2010;16(5):1645-55.
52. Giannoudis PV, Einhorn TA, Schmidmaier G, Marsh D. The diamond concept – open questions. *Injury*. 2008;39, Supplement 2:S5-S8.
53. Kunisaki SM, Jennings RW, Fauza DO. Fetal Cartilage Engineering from Amniotic Mesenchymal Progenitor Cells. *Stem Cells and Development*. 2006;15(2):245-53.
54. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology*. 2007;213(2):341-7.
55. Velasco MA, Narváez-Tovar CA, Garzón-Alvarado DA. Design, Materials, and Mechanobiology of Biodegradable Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *BioMed Research International*. 2015;2015:729076.
56. Gamie Z, Tran GT, Vyzas G, Korres N, Heliotis M, Mantalaris A, et al. Stem cells combined with bone graft substitutes in skeletal tissue engineering. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2012;12(6):713-29.
57. Baroli B. From natural bone grafts to tissue engineering therapeutics: Brainstorming on pharmaceutical formulative requirements and challenges. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;98(4):1317-75.
58. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in biotechnology*. 2012;30(10):546-54.
59. Watanabe M, Li H, Roybal J, Santore M, Radu A, Jo J-I, et al. A Tissue Engineering Approach for Prenatal Closure of Myelomeningocele: Comparison of Gelatin Sponge and Microsphere Scaffolds and Bioactive Protein Coatings. *Tissue Engineering Part A*. 2011/04/01;17(7-8):1099-110.

60. Eggink AJ, Roelofs LAJ, Feitz WFJ, Wijnen RMH, Mullaart RA, Grotenhuis JA, et al. In utero Repair of an Experimental Neural Tube Defect in a Chronic Sheep Model Using Biomatrices. *Fetal Diagnosis and Therapy*. 2005;20(5):335-40.
61. Eggink AJ, Roelofs LAJ, Lammens MMY, Feitz WFJ, Wijnen RMH, Mullaart RA, et al. Histological Evaluation of Acute Covering of an Experimental Neural Tube Defect with Biomatrices in Fetal Sheep. *Fetal Diagnosis and Therapy*. 2006;21(2):210-6.
62. Eggink AJ, Roelofs LAJ, Feitz WFJ, Wijnen RMH, Lammens MMY, Mullaart RA, et al. Delayed Intrauterine Repair of an Experimental Spina Bifida with a Collagen Biomatrix. *Pediatric Neurosurgery*. 2008;44(1):29-35.
63. Fontecha CG, Peiro JL, Aguirre M, Soldado F, Añor S, Fresno L, et al. Inert patch with bioadhesive for gentle foetal surgery of myelomeningocele in a sheep model. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2009;146(2):174-9.
64. Fontecha CG, Peiro JL, Sevilla JJ, Aguirre M, Soldado F, Fresno L, et al. Fetoscopic coverage of experimental myelomeningocele in sheep using a patch with surgical sealant. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2011;156(2):171-6.
65. Oliveira RdCSe, Valente PR, Abou-Jamra RC, Araújo A, Saldiva PH, Pedreira DAL. Biosynthetic cellulose induces the formation of a neoduramater following pre-natal correction of meningomyelocele in fetal sheep. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2007;22:174-81.
66. Saadai P, Nout YS, Encinas J, Wang A, Downing TL, Beattie MS, et al. Prenatal repair of myelomeningocele with aligned nanofibrous scaffolds—a pilot study in sheep. *Journal of Pediatric Surgery*. 2011;46(12):2279-83.
67. Herrera SR, Leme RJ, Nishikuni K, Valente PR, Caldini EG, Saldiva PH, et al. Comparison between two surgical techniques for prenatal correction of meningomyelocele in sheep. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2012;40(S1):8-.
68. Saadai P, Wang A, Nout YS, Downing TL, Lofberg K, Beattie MS, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived neural crest stem cells integrate into the injured spinal cord in the fetal lamb model of myelomeningocele. *Journal of Pediatric Surgery*. 2013;48(1):158-63.
69. Brown EG, Saadai P, Pivetti CD, Beattie MS, Bresnahan JC, Wang A, et al. In utero repair of myelomeningocele with autologous amniotic membrane in the fetal lamb model. *Journal of Pediatric Surgery*. 2014;49(1):133-8.
70. Antonucci I, Stuppia L, Kaneko Y, Yu S, Tajiri N, Bae EC, et al. Amniotic Fluid as a Rich Source of Mesenchymal Stromal Cells for Transplantation Therapy. *Cell Transplantation*. 2011;20(6):789-95.
71. Miranda-Sayago JM, Fernandez-Arcas N, Benito C, Reyes-Engel A, Carrera J, Alonso A. Lifespan of human amniotic fluid-derived multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2011;13(5):572-81.
72. Sessarego N, Parodi A, Podesta M, Benvenuto F, Moggi M, Raviolo V, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. *Haematologica*. 2008 March 1, 2008;93(3):339-46.
73. Marcus AJ, Woodbury D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: Do not discard: Stem Cells Review Series. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2008;12(3):730-42.
74. Prusa A-R, Marton E, Rosner M, Bettelheim D, Lubec G, Pollack A, et al. Neurogenic cells in human amniotic fluid. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2004;191(1):309-14.
75. Hipp J, Atala A. Sources of Stem Cells for Regenerative Medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2008;4(1):3-11.
76. Jezierski A, Gruslin A, Tremblay R, Ly D, Smith C, Turksen K, et al. Probing Stemness and Neural Commitment in Human Amniotic Fluid Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2010;6(2):199-214.
77. Kim J, Lee Y, Kim H, Hwang KJ, Kwon HC, Kim SK, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Proliferation*. 2007;40(1):75-90.

78. De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotech.* 2007;25(1):100-6.
79. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology.* 2015;45(1):16-26.
80. Sousa BR, Parreira RC, Fonseca EA, Amaya MJ, Tonelli FMP, Lacerda SMSN, et al. Human adult stem cells from diverse origins: An overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytometry Part A.* 2014;85(1):43-77.
81. Prusa A-R, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschlager M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod.* 2003 July 1, 2003;18(7):1489-93.
82. Pappa KI, Anagnou NP. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regenerative Medicine.* 2009;4(3):423-33.
83. Zhou J, Wang D, Liang T, Guo Q, Zhang G. Amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells: characteristics and therapeutic applications. *Arch Gynecol Obstet.* 2014/08/01;290(2):223-31. English.
84. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-5.
85. Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A, Fischer I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Experimental hematology.* 2008;36(9):1176-85.
86. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui J-G, Prockop DJ. Expansion of Human Adult Stem Cells from Bone Marrow Stroma: Conditions that Maximize the Yields of Early Progenitors and Evaluate Their Quality. *STEM CELLS.* 2002;20(6):530-41.
87. Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical Parameters for the Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood. *Stem Cells.* 2004 July 1, 2004;22(4):625-34.
88. Lund P, Pilgaard L, Duroux M, Fink T, Zachar V. Effect of growth media and serum replacements on the proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells. *Cytotherapy.* 2009;11(2):189-97.
89. Baghaban Eslaminejad M, Jahangir S. Amniotic Fluid Stem Cells and Their Application in Cell-Based Tissue Regeneration. *International Journal of Fertility & Sterility.* 2012;6(3):147-56.
90. Sikkema-Raddatz B. Quality assessment of prenatal cytogenetic diagnosis : some guidelines for handling amniotic fluid and chorionic villus material. Department of Medical Genetics, University of Groningen, The Netherlands. 2005;Chapter 2 (Cell culture of amniotic fluid cells):35-70.
91. Antonucci I, Stuppia L, Kaneko Y, Yu S, Tajiri N, Bae EC, et al. Amniotic Fluid as Rich Source of Mesenchymal Stromal Cells for Transplantation Therapy. *ct.* 2010.
92. Roubelakis MG, Bitsika V, Zagoura D, Trohatou O, Pappa KI, Makridakis M, et al. In vitro and in vivo properties of distinct populations of amniotic fluid mesenchymal progenitor cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2010; 9 pag.
93. Tarte K, Gaillard J, Lataillade J-J, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood.* 2010;115(8):1549-53.
94. Prockop DJ, Brenner M, Fibbe WE, Horwitz E, Le Blanc K, Phinney DG, et al. Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy.* 2010;12(5):576-8.
95. Alves H, Munoz-Najar U, De Wit J, Renard AJS, Hoeijmakers JHJ, Sedivy JM, et al. A link between the accumulation of DNA damage and loss of multi-potency of human mesenchymal stromal cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2010;14(12):2729-38.

96. Jethva R, Otsuru S, Dominici M, Horwitz EM. Cell therapy for disorders of bone. *Cytotherapy*. 2009;11(1):3-17.
97. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *The Lancet*. 2008;371(9624):1579-86. PubMed PMID: S0140-6736(08)60690-X.
98. Kebriaei P, Robinson S. Treatment of graft-versus-host-disease with mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2011;13(3):262-8.
99. Uccelli A, Laroni A, Freedman MS. Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *The Lancet Neurology*. 2011;10(7):649-56. PubMed PMID: S1474-4422(11)70121-1.
100. Wright KT, Masri WE, Osman A, Chowdhury J, Johnson WEB. Concise Review: Bone Marrow for the Treatment of Spinal Cord Injury: Mechanisms and Clinical Applications. *STEM CELLS*. 2011;29(2):169-78.
101. Schop D, Janssen FW, van Rijn LDS, Fernandes H, Bloem RM, de Bruijn JD, et al. Growth, Metabolism, and Growth Inhibitors of Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering Part A*. 2009;15(8):1877-86.
102. Kunisaki SM, Fuchs JR, Steigman SA, Fauza DO. A Comparative Analysis of Cartilage Engineered from Different Perinatal Mesenchymal Progenitor Cells. *Tissue Engineering*. 2007;13(11):2633-44.
103. S.W. Steven Shaw SB, Khalil Abi Nader, Annalisa Gastadello, Vedanta Mehta, Elisa Filppi, et al. Autologous transplantation of amniotic fluid derived mesenchymal stem cells into sheep fetuses Cell Transplantation. 2011.
104. Rozemuller H, Prins H-J, Naaijken B, Staal J, Bähring H-Jr, Martens AC. Prospective Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Multiple Mammalian Species Using Cross-Reacting Anti-Human Monoclonal Antibodies. *Stem Cells and Development*. 19(12):1911-21.
105. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
106. Mauro A, Turriani M, Ioannoni A, Russo V, Martelli A, Di Giacinto O, et al. Isolation, characterization, and in vitro differentiation of ovine amniotic stem cells. *Veterinary Research Communications*. 2010;34(0):25-8.
107. Morigi M, Rota C, Montemurro T, Montelatici E, Lo Cicero V, Imberti B, et al. Life-Sparing Effect of Human Cord Blood-Mesenchymal Stem Cells in Experimental Acute Kidney Injury. *STEM CELLS*. 2010;28(3):513-22.
108. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Experimental hematology*. 2004;32(12):1212-25.
109. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the Optimal Culture Conditions for Clinical Scale Production of Human Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS*. 2006;24(2):462-71.
110. Ho AD, Wagner W, Franke W. Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy*. 2008;10(4):320-30.
111. Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. In Vitro High-Capacity Assay to Quantify the Clonal Heterogeneity in Trilineage Potential of Mesenchymal Stem Cells Reveals a Complex Hierarchy of Lineage Commitment. *STEM CELLS*. 2010;28(4):788-98.
112. Martin Vaegler JKM, Bastian Amend, Luis Arenas da Silva, Julia G. Mannheim, Kerstin Fuchs, Susanne Will, Karl D. Sievert, Arnulf Stenzl, Melanie L. Hart and Wilhelm K. Aicher. Labelling and Tracking of Human Mesenchymal Stromal Cells in Preclinical Studies and Large Animal Models of Degenerative Diseases. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2014;9(5):444-50.

113. Kim J, Kalimuthu S, Ahn B-C. In Vivo Cell Tracking with Bioluminescence Imaging. *Nucl Med Mol Imaging*. 2015;49(1):3-10.
114. Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking. *Stem Cells International*. 2013;2013:8.
115. Peng X-H, Qian X, Mao H, Wang AY, Chen Z, Nie S, et al. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *International Journal of Nanomedicine*. 2008;3(3):311-21.
116. Reagan MR, Kaplan DL. Concise Review: Mesenchymal Stem Cell Tumor-Homing: Detection Methods in Disease Model Systems. *STEM CELLS*. 2011;29(6):920-7.
117. Detante O, Valable S, de Fraipont F, Grillon E, Barbier EL, Moisan A, et al. Magnetic Resonance Imaging and Fluorescence Labeling of Clinical-Grade Mesenchymal Stem Cells Without Impacting Their Phenotype: Study in a Rat Model of Stroke. *Stem Cells Translational Medicine*. 2012;1(4):333-40.
118. Farrell E, Wielopolski P, Pavljasevic P, van Tiel S, Jahr H, Verhaar J, et al. Effects of iron oxide incorporation for long term cell tracking on MSC differentiation in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;369(4):1076-81.
119. Jasmin, Torres ALM, Nunes HMP, Passipieri JA, Jelicks LA, Gasparetto EL, et al. Optimized labeling of bone marrow mesenchymal cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and in vivo visualization by magnetic resonance imaging. *Journal of Nanobiotechnology*. 2011;9:4-.
120. Balakumaran A, Pawelczyk E, Ren J, Sworder B, Chaudhry A, Sabatino M, et al. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Labeling of Bone Marrow Stromal (Mesenchymal) Cells Does Not Affect Their "Stemness". *PLoS ONE*. 2010;5(7):e11462.
121. Slotkin J, Cahill K, Tharin S, Shapiro E. Cellular magnetic resonance imaging: Nanometer and micrometer size particles for noninvasive cell localization. *Neurotherapeutics*. 2007;4(3):428-33.
122. Qi Y, Feng G, Huang Z, Yan W. The application of super paramagnetic iron oxide-labeled mesenchymal stem cells in cell-based therapy. *Mol Biol Rep*. 2013;40(3):2733-40.
123. Boutry S, Brunin S, Mahieu I, Laurent S, Elst LV, Muller RN. Magnetic labeling of non-phagocytic adherent cells with iron oxide nanoparticles: a comprehensive study. *Contrast Media & Molecular Imaging*. 2008;3(6):223-32.
124. Nohroudi K, Arnhold S, Berhorn T, Addicks K, Hoehn M, Himmelreich U. In Vivo MRI Stem Cell Tracking Requires Balancing of Detection Limit and Cell Viability. *Cell Transplantation*. 2010;19(4):431-41.
125. Hinds KA, Hill JM, Shapiro EM, Laukkanen MO, Silva AC, Combs CA, et al. Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. *2003-08-01 00:00:00*. 867-72 p.
126. Shapiro EM, Sharer K, Skrtic S, Koretsky AP. In vivo detection of single cells by MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2006;55(2):242-9.
127. Delo DM, Olson J, Baptista PM, D'Agostino RB, Atala A, Zhu J-M, et al. Non-invasive Longitudinal Tracking of Human Amniotic Fluid Stem Cells in the Mouse Heart. *Stem Cells and Development*. 2008;17(6):1185-93.
128. Zwingmann J, Mehlhorn AT, Südkamp N, Stark B, Dauner M, Schmal H. Chondrogenic Differentiation of Human Articular Chondrocytes Differs in Biodegradable PGA/PLA Scaffolds. *Tissue Engineering Part A*. 2007;13(9):2335-43.
129. Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical applications of biodegradable polymers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 2011;49(12):832-64.
130. Erggelet C, Neumann K, Endres M, Haberstroh K, Sittinger M, Kaps C. Regeneration of ovine articular cartilage defects by cell-free polymer-based implants. *Biomaterials*. 2007;28(36):5570-80.
131. Han SH, Kim YH, Park MS, Kim IA, Shin JW, Yang WI, et al. Histological and biomechanical properties of regenerated articular cartilage using chondrogenic bone

marrow stromal cells with a PLGA scaffold in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2008;87A(4):850-61.

132. Ren T, Ren J, Jia X, Pan K. The bone formation in vitro and mandibular defect repair using PLGA porous scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2005;74A(4):562-9.

133. He L, Zhang Y, Zeng C, Ngiam M, Liao S, Quan D, et al. Manufacture of PLGA Multiple-Channel Conduits with Precise Hierarchical Pore Architectures and In Vitro/Vivo Evaluation for Spinal Cord Injury. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2009;15(2):243-55.

134. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton PV. An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(3):3640-59.

135. Caminal M, Peris D, Fonseca C, Barrachina J, Codina D, Rabanal RM, et al. Cartilage resurfacing potential of PLGA scaffolds loaded with autologous cells from cartilage, fat, and bone marrow in an ovine model of osteochondral focal defect. *Cytotechnology*. 2015:1-13.

136. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Differentiation-Dependent Gene Expression of Matrix Components. *Experimental Cell Research*. 2001;268(2):189-200.

137. Brown EG, Keller BA, Pivetti CD, Farmer DL. Innate healing in the fetal sheep model of myelomeningocele: A standardized defect grading system. *Journal of Pediatric Surgery*. 2014;50(7):1134-6.

138. Dionigi B, Ahmed A, Brazzo Iii J, Connors JP, Zurakowski D, Fauza DO. Partial or complete coverage of experimental spina bifida by simple intra-amniotic injection of concentrated amniotic mesenchymal stem cells. *Journal of Pediatric Surgery*. 2015 1//;50(1):69-73.

139. Li Y, Meng H, Liu Y, Lee BP. Fibrin Gel as an Injectable Biodegradable Scaffold and Cell Carrier for Tissue Engineering. *The Scientific World Journal*. 2015;2015:10.

140. Brown AC, Barker TH. Fibrin-based biomaterials: Modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. *Acta Biomaterialia*. 2014;10(4):1502-14.

141. Mandell SP, Gibran NS. Fibrin sealants: surgical hemostat, sealant and adhesive. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2014;14(6):821-30. PubMed PMID: 24625330.

142. Wu X, Ren J, Li J. Fibrin glue as the cell-delivery vehicle for mesenchymal stromal cells in regenerative medicine. *Cytotherapy*. 2012;14(5):555-62.

143. Trombi L, D'Alessandro D, Pacini S, Fiorentino B, Scarpellini M, Fazzi R, et al. Good manufacturing practice-grade fibrin gel is useful as a scaffold for human mesenchymal stromal cells and supports in vitro osteogenic differentiation. *Transfusion*. 2008;48(10):2246-51.

144. Murphy K, Fang S, Leach JK. Human mesenchymal stem cell spheroids in fibrin hydrogels exhibit improved cell survival and potential for bone healing. *Cell Tissue Res*. 2014;357(1):91-9.

145. Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: A REVIEW OF THE LITERATURE. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*. 2009 August 1, 2009;91-B(8):987-96.

146. Anitua E, Alonso R, Girbau C, Aguirre JJ, Muruzabal F, Orive G. Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF®-Endoret®) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2012;37(6):652-7.

147. Bara JJ, Herrmann M, Menzel U, Benneker L, Alini M, Stoddart MJ. Three-dimensional culture and characterization of mononuclear cells from human bone marrow. *Cytotherapy*. 2015;17(4):458-72.

148. Wendy Ho BT, James C.Y. Dunn, Benjamin M. Wu. . The Behavior of Human Mesenchymal Stem Cells in 3D Fibrin Clots: Dependence on Fibrinogen Concentration and Clot Structure. *Tissue Engineering Part A*. 2006;12(6):1587-95.
149. Kim YS, Choi YJ, Suh DS, Heo DB, Kim YI, Ryu J-S, et al. Mesenchymal Stem Cell Implantation in Osteoarthritic Knees: Is Fibrin Glue Effective as a Scaffold? *The American Journal of Sports Medicine*. 2015 January 1, 2015;43(1):176-85.
150. Sensebé L, Fleury-Cappellesso S. Biodistribution of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in a Preclinical Setting. *Stem Cells International*. 2013;2013:678063.
151. Aghdasi B, Montgomery SR, Daubs MD, Wang JC. A review of demineralized bone matrices for spinal fusion: The evidence for efficacy. *The Surgeon*. 2013;11(1):39-48.
152. Gruskin E, Doll BA, Futrell FW, Schmitz JP, Hollinger JO. Demineralized bone matrix in bone repair: History and use. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64(12):1063-77.
153. Holt DJ, Grainger DW. Demineralized bone matrix as a vehicle for delivering endogenous and exogenous therapeutics in bone repair. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64(12):1123-8.
154. Moore ST, Katz JM, Zhukauskas RM, Hernandez RM, Lewis CS, Supronowicz PR, et al. Osteoconductivity and Osteoinductivity of Puros® DBM Putty. *Journal of Biomaterials Applications*. 2011 August 1, 2011;26(2):151-71.
155. Linero I, Chaparro O. Paracrine Effect of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue in Bone Regeneration. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e107001.
156. Wang A, Brown EG, Lankford L, Keller BA, Pivetti CD, Sitkin NA, et al. Placental Mesenchymal Stromal Cells Rescue Ambulation in Ovine Myelomeningocele. *Stem Cells Translational Medicine*. 2015 June 1, 2015;4(6):659-69.
157. Hejazi S, Yaghoubi S, Delghandi M, Javid F. Histogenesis study of skin in sheep. *Life Science Journal*. 2013;10(5s):194-8.
158. Vives J, Carmona G. *Guide to Cell Therapy GxP: Quality Standards in the Development of Cell-Based Medicines in Non-pharmaceutical Environments: ACADEMIC PRESS; 2015.*
159. Bevilacqua NS, Pedreira DAL. Fetoscopy for meningomyelocele repair: past, present and future. *Einstein (São Paulo)*. 2015;13:283-9.
160. Schlievert P JW, Galask RP. Amniotic fluid antibacterial mechanisms: newer concepts. *Seminars in Perinatology*. 1977;1(1):59-70.
161. Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, et al. Human Alternatives to Fetal Bovine Serum for the Expansion of Mesenchymal Stromal Cells from Bone Marrow. *STEM CELLS*. 2009;27(9):2331-41.
162. Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(21):11400-6.
163. Fonseca C, Caminal M, Peris D, Barrachina J, Fàbregas PJ, Garcia F, et al. An arthroscopic approach for the treatment of osteochondral focal defects with cell-free and cell-loaded PLGA scaffolds in sheep. *Cytotechnology*. 2014;66(2):345-54.

ANNEX: SIGLES I ACRÒNIMS

µL	microlitre
µmax	Velocitat de creixement màxima
7AAD	7-Aminoactinomicina D
Ab/Am	Penicil·lina/Estreptomicina/Amfotericina B
AF	Líquid Amniòtic (Amniotic Fluid)
AF-oMSC	Cèl·lula Mesenquimal Estromal de Líquid Amniòtic oví (Amniotic Fluid derived ovine Mesenchymal Stromal Cell)
bFGF	Factor de Creixement Fibroblàstic bàsic (basic Fibroblast Growth Factor)
BMP	Proteïna Morfogènica de l'Os (Bone Morphogenetic Protein)
CEEA	Comitè Ètic d'Experimentació Animal
CFU-F	Unitat Formadora de Colònia Fibroblàstica (Colony-Forming Unit Fibroblasts)
DAM	Deshidració, acondicionament i muntatge
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DBM	Matriu Òssia Desmineralitzada (Demineralized Bone Matrix)
ECM	Matriu Extracel·lular (Extracellular Matrix)
eGFP	Proteïna Verda Fluorescent (enhanced Green Fluorescent Protein)
ET	Enginyeria Tissular
FBS	Sèrum Boví Fetal (Fetal Bovine Serum)
FDA	Food and Drug Administration
Fexp	Factor d'Expansió
FGF	Factor de Creixement Fibroblàstic (Fibroblast Growth Factor)
FPA	Fibrinopèptid A
FPB	Fibrinopèptid B

FSC	Llum dispersada en la direcció de la llum incident en un citòmetre de flux laminar; proporcional a la grandària de la partícula que produeix la dispersió (Forward S Catter)
h	Hora
HE	Hematoxilina-Eosina
IGF	Factor de Creixement Insulina-Like (I nsulin G rowth F actor)
IHQ	Immunohistoquímica
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
LCR	Líquid Cefaloraquidi
min	minut
mL	mil·lilitre
MMC	Mielomeningocele
MPIO	Micropartícula d'Òxid de Ferro
MSC	Cèl·lula Mesenquimal Estromal (M esenchymal S tromal C ell)
NaCl	Clorur de Sodi
Nd	Nombre de duplicacions
ng	nanogram
PDGF	Factors de creixement derivat de les Plaquetes (P latelet- d erived G rowth F actor)
PGA	Àcid poliglicòlic
PLA	Àcid polilàctic
PLGA	Àcid polilàctic-co-glicòlic
PPP	Plasma Pobre en Plaquetes
RMN	Ressonància Magnètica Nuclear
SA-βgal	Activitat β-galactosidasa associada a senescència

SSC	Llum dispersada en angle recte respecte la llum incident en un citòmetre de flux laminar; proporcional a la complexitat de l'estructura interna de la partícula que produeix la dispersió (Side SCatter)
T.A.	Temperatura Ambient
td	Temps de duplicació
TE	Temps d'Eco
TGF-β	Factor de Transformació del Creixement β (Transforming Growth Factor β)

