

## Neurocirugía regenerativa en el paciente parapléjico: Esperanzas y realidades

Regenerative neurosurgery in the paraplegic patient: Hopes and realities

Jesús Vaquero Crespo

Académico Correspondiente de la Real Academia de Doctores de España. Sección de Medicina.  
jvaquero@telefonica.net

Anales Real Academia de Doctores de España. Volumen 3, número extraordinario 2018 pp. 423-472.

### RESUMEN

Se presenta un resumen de los estudios preclínicos que han llevado a la realización del primer Ensayo Clínico de terapia celular autorizado en España para el tratamiento de pacientes con paraplejía traumática completa y crónicamente establecida. Los resultados de este Ensayo han abierto una puerta de esperanza a pacientes con gran discapacidad secundaria a una lesión medular y marcan las pautas de lo que ya se conoce como Neurocirugía Regenerativa.

### ABSTRACT

A summary of the preclinical studies that led to the first clinical trial of cell therapy authorized in Spain for the treatment of patients with complete and chronically established traumatic paraplegia is presented. The results of this trial have opened a door of hope for patients with great disability secondary to a spinal cord injury and set the standards for what is known as Regenerative Neurosurgery.

**PALABRAS CLAVE:** Médula espinal. Paraplejía. Terapia celular

**KEYWORDS:** Spinal cord. Paraplegia. Cell therapy

## INTRODUCCIÓN

---

En los últimos años está cobrando importancia el estudio de la plasticidad del Sistema Nervioso, abriéndose nuevas esperanzas y perspectivas para el tratamiento de lesiones y enfermedades neurológicas hasta ahora consideradas incurables, y en este campo de investigación, la posibilidad de recuperar la función neurológica en pacientes con lesiones traumáticas crónicas del Sistema Nervioso representa un reto biológico, médico y social. No debe extrañar, por tanto, que las fascinantes propiedades que se han atribuido muy recientemente a las células madre ya sean embrionarias o incluso adultas, requieran múltiples esfuerzos de investigación con la finalidad de conocer su posible utilidad terapéutica. Este trabajo muestra la experiencia preclínica de más de 20 años de investigación en modelos animales de paraplejia traumática sobre los que se ha realizado un trasplante intralesional de células madre mesenquimales adultas y los resultados del primer Ensayo Clínico autorizado en España para la aplicación de estas técnicas en pacientes con paraplejia completa, crónicamente establecida.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS PLANTEADOS EN NUESTROS ESTUDIOS PRECLÍNICOS

---

La hipótesis de trabajo que se estableció fue que, basándonos en las experiencias previas que hemos descrito, la presencia de células madre mesenquimales adultas, en el tejido previamente traumatizado de la médula espinal, puede tener un efecto terapéutico, logrando recuperación funcional, en animales parapléjicos crónicos, sin necesidad de proceder a la diferenciación *in vitro* de las células madre mesenquimales hacia un fenotipo neuronal. Una recuperación funcional significativa, en comparación con animales control, había sido descrita en la literatura a partir de los primeros años de la pasada década, pero en modelos de lesión medular incompleta y realizando el implante intralesional de células madre adultas mesenquimales a la semana de la lesión.

Como detalles importantes y originales de nuestro estudio de investigación preclínica, cabe destacar:

- 1) Se utilizó un modelo de lesión traumática severa, causante de paraplejia crónica.

- 2) Se hizo el implante de células madre mesenquimales de forma tardía, sobre un modelo de paraplejia crónica irreversible y además, sin diferenciación previa, *in vitro*, de las células madre trasplantadas.

Estos planteamientos permitieron contar con un esquema terapéutico reproducible en clínica, ya que esta técnica podría ser utilizada sobre pacientes en fase de paraplejia ya establecida, y abordar la posibilidad de que pudiera haber recuperación funcional espontánea tras la lesión traumática. Teniendo en cuenta estos detalles, los principales objetivos que nos planteamos fueron los siguientes:

- Verificar si la técnica de implante intralesional de células madre mesenquimales lograba algún tipo de recuperación funcional en un modelo experimental de lesión traumática causante de paraplejia supuestamente irreversible.
- En caso de resultados positivos, estudiar morfológicamente la zona de lesión medular, al objeto de conocer las posibles modificaciones histológicas relacionables con la recuperación motora de los animales.
- Desarrollar así una técnica que pudiera ser la base para la utilización de esta modalidad de terapia celular en clínica, sobre pacientes con lesiones traumáticas del Sistema Nervioso.

## METODOLOGÍA UTILIZADA

---

### Obtención de células madre mesenquimales de rata

Para los primeros estudios preclínicos se utilizaron ratas macho Wistar entre 200 y 250 g de peso. Tras sacrificar los animales con una mezcla de 70%CO<sub>2</sub> y 30%O<sub>2</sub>, se aislaron las tibias y los fémures siendo inmediatamente colocados a 4°C en medio alfa-MEM/10% FBS suplementado con antibiótico (Azizi y cols, 1998). Tras cortar las epífisis de los huesos en condiciones estériles (bajo campana de flujo laminar) la médula ósea fue extraída mediante lavado de los huesos con una jeringuilla (26G) cargada con 2cc de medio alfa-MEM completo suplementado con antibiótico y 10% de suero fetal bovino. Posteriormente las células de la médula ósea fueron disgregadas mediante pipeteado y luego filtradas a través de una malla de nylon de 70 micras. La suspensión celular obtenida fue sometida a una centrifugación en gradiente de densidad (Técnica de Ficoll-Hypaque). Esta técnica consiste en colocar la muestra de médula ósea diluida con medio de cultivo en una proporción 1:1 ó 1:2 sobre una solución de Ficoll (9 cc de muestra por cada 6cc de linfoprep) con el objetivo de intentar eliminar células CD45 y glicoforina-A positivas. Tras la

centrifugación a 2500g durante 30 minutos se recoge el sobrenadante y la interfase, siendo estos resuspendidos en medio Hank's sin calcio y magnesio, pero con antibiótico, o en medio alfa-DMEM/10% FBS con antibiótico. Las células son nuevamente centrifugadas a 1500 g durante 15 minutos y el precipitado es resuspendido en 20 cc de medio alfa-MEM con 2mM de L-glutamina, un 20% de suero fetal bovino (FBS), 100u/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin, 5 µg/ml de gentamicina y sin deoxiribonucleótidos ni ribonucleótidos. Finalmente, las células se colocan en un frasco de cultivo de 175 cm<sup>2</sup> e incubadas en una estufa a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. A las 48 horas de incubación, el sobrenadante conteniendo restos celulares y células no adherentes son eliminados, quedándonos solamente con las células adherentes. Posteriormente el cultivo se lava al menos dos veces con buffer fosfato salino (PBS) a pH:7,4 estéril, añadiendo posteriormente 12 mL de medio alfa-MEM completo con 20% de FBS, que es reemplazado cada 2-3 días, durante 14 días.

Cuando las células alcanzan un desarrollo cercano a la confluencia, éstas son levantadas del frasco de cultivo mediante su incubación con 3 ml de tripsina 0.25%/1mM EDTA durante 4-5 minutos a 37°C. Tras este periodo de incubación la tripsina es inactivada con 6 ml de medio alfa-MEM completo. Las células obtenidas tras ser centrifugadas a 1200 rpm durante 15 minutos son lavadas al menos dos veces con medio alfa-MEM/10%FBS mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos cada lavado. Finalmente, el "pellet" obtenido es diluido en medio alfa-MEM/20%FBS y sometido a recuento mediante el test de viabilidad de azul tripán. Tras el recuento, las células madre son subcultivadas en frascos de 75 cm<sup>2</sup> en una concentración de 8000 células/cm<sup>2</sup> en presencia de 12cc de medio alfa-MEM/20%FBS con antibióticos y glutamina, a una concentración de 2mM.

### **Caracterización fenotípica de las células madre mesenquimales**

Para caracterizar inmunohistoquímicamente las células madre obtenidas por el procedimiento descrito en el apartado anterior éstas fueron puestas en cultivo con medio alfa-MEM/20%FBS suplementado con antibióticos y glutamina sobre portaobjetos estériles e incubadas a 37°C y con un 5% de CO<sub>2</sub>. Al cabo de 48 horas de cultivo los portaobjetos fueron lavados con buffer PBS y las células fijadas con paraformaldehído tamponado al 4%. A continuación, tras llevar a cabo el desenmascaramiento antigénico de las células con buffer citrato pH.6 durante 10 minutos en microondas, se procedió a inhibir la peroxidasa endógena mediante la incubación de las células con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 30 minutos. Posteriormente tras lavar las células con PBS se procedió al bloqueo de los sitios no específicos mediante la incubación de las células con suero no inmune de caballo al 8% durante 30 minutos. Sin lavar las muestras, solo retirando el exceso de suero no inmune, se añade a las células el anticuerpo primario y se deja incubar toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Tras lavar dos veces las células con PBS se

añade el anticuerpo secundario biotinilado, dejándolo actuar 30 minutos al cabo de los cuales las células se lavan dos veces con PBS y se incuban con streptoavidina-peroxidasa, también 30 minutos para posteriormente ser reveladas mediante la adición de diaminobenzidina (DAB).

Los anticuerpos utilizados para identificar fenotípicamente las células madre adultas mesenquimales fueron los siguientes:

1.- CD105 (SH2):	POSITIVO
2.- CD73 (SH3):	POSITIVO
3.- SH4:	POSITIVO
4.- Vimentina:	POSITIVO
5.- CD34:	NEGATIVO
6.- CD45:	NEGATIVO
7.- CD3:	NEGATIVO
8.- CD14:	NEGATIVO (Mononucleares)
9.- CD19:	NEGATIVO (Linfocitos B)
10.- CD38:	NEGATIVO (Células mieloides)
11.- Glicoforina A:	NEGATIVO (Marcador de eritrocitos)
12.- HLA I	NEGATIVO

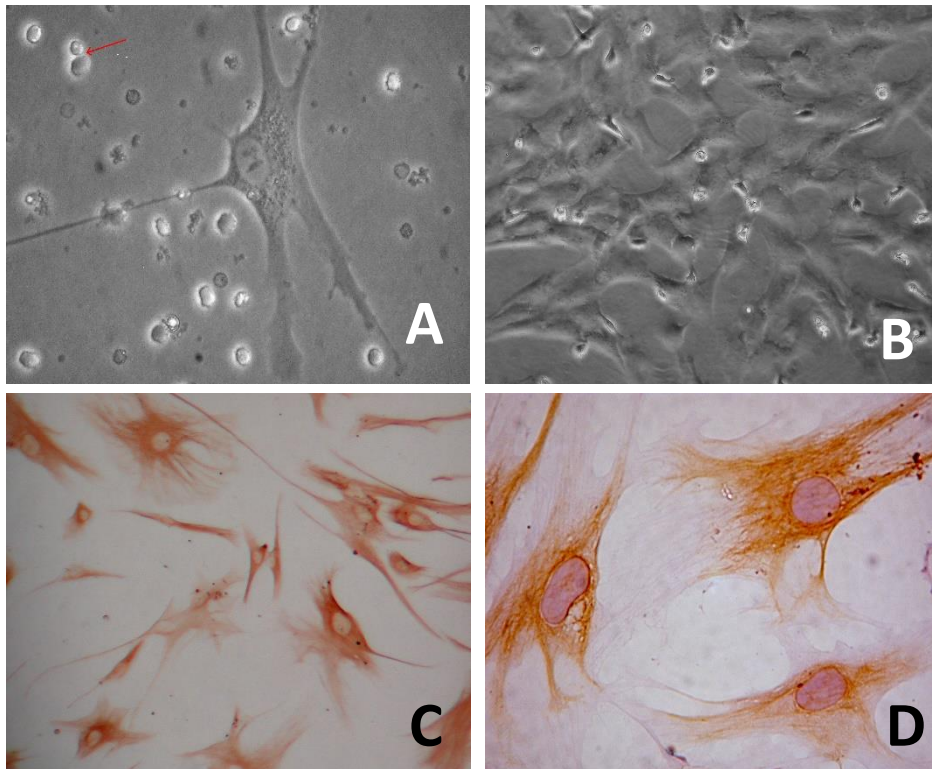


Figura 1. Células mesenquimales de rata Wistar. A y B: Estudio en contraste de fase. C y D, expresión citoquímica de laminina y vimentina, respectivamente.

### Modelo de lesión traumática medular

Aunque se utilizó un número total de más de 700 animales para las observaciones que se describen, al objeto de poder presentar una visión global de los resultados obtenidos se hará una referencia general al trabajo realizado, omitiendo el número concreto de animales utilizados en el desarrollo de cada protocolo experimental. En cualquier caso, para el presente estudio se utilizaron ratas Wistar, hembras de 250-300 g de peso, que fueron anestesiadas con Halotano y sometidas posteriormente a una laminectomía a nivel T6-T8. Tras la exposición de la médula espinal, se produjo una lesión medular traumática dejando caer, desde una altura de 20 cm, sobre la superficie dorsal de la médula expuesta, una barra de 12 mm<sup>2</sup> de sección y 25 g de peso. Esta barra es guiada en su caída a través de un cilindro hueco, adaptado al área de la laminectomía.

En todos los animales se observó una paraplejia inmediata tras el impacto traumático. En este modelo experimental, tras la lesión traumática se observa de forma característica una necrosis centromedular que puede afectar entre 1 y 2 segmentos medulares. Esta cavidad es perfectamente visible en todos los casos, a la semana del traumatismo y se asocia a una paraplejia irreversible en la rata Wistar.

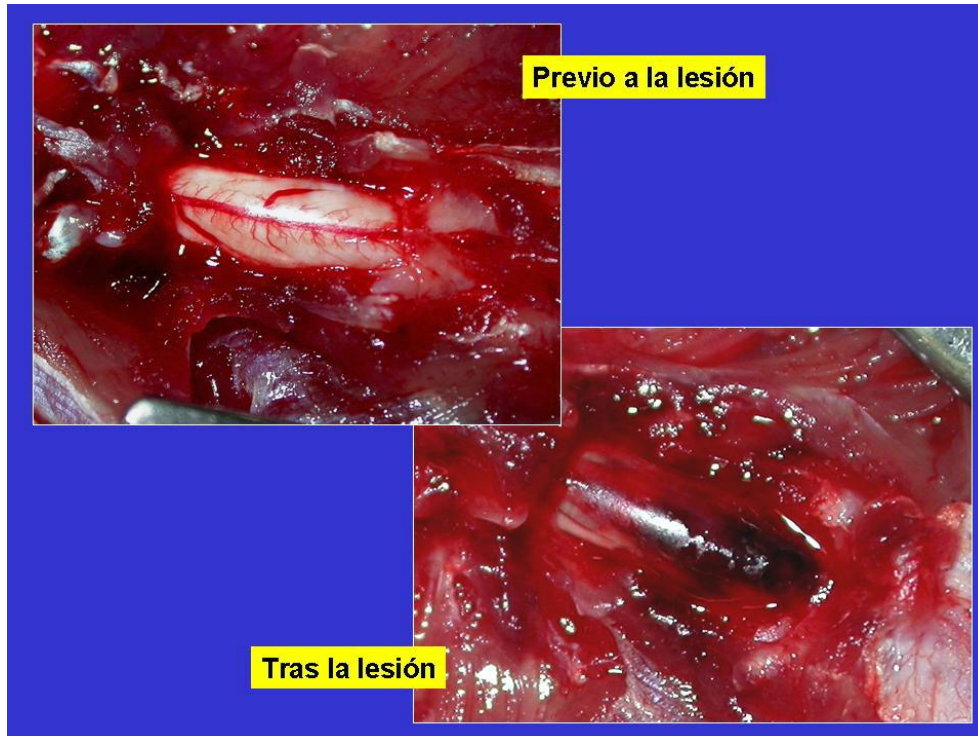


Figura 2.- Aspecto de la médula espinal, antes y después de la lesión traumática experimental.

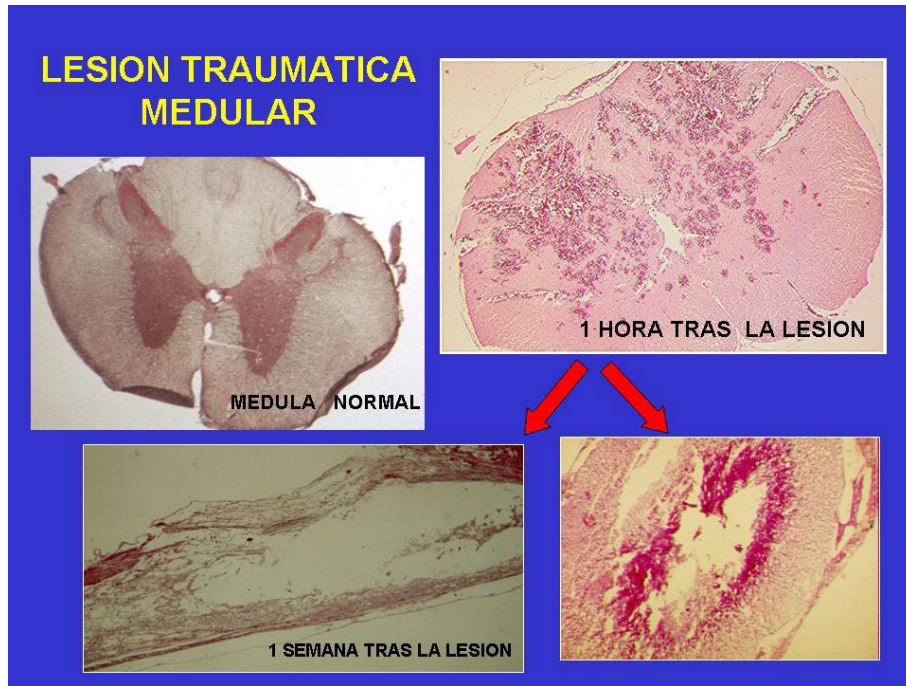


Figura 3.- En este modelo, se aprecian microhemorragias intramedulares, una hora tras la contusión traumática, que evolucionan a la necrosis centromedular, al cabo de 5-7 días tras el traumatismo.

### Cuidado postoperatorios y técnica del implante intralesional de células madre mesenquimales

Los cuidados postoperatorios de los animales traumatizados consistieron en el vaciamiento vesical cada 8 horas por presión manual, administración de Ringer lactato intraperitoneal para evitar la deshidratación, administración de gentamicina (0.8 mg/100 g, intraperitoneal) durante una semana, e inspección visual diaria de la piel para detectar y tratar la aparición de úlceras por decúbito. Tres meses después de la lesión, mediante estudios de Resonancia Magnética se identificó, en los animales parapléjicos, la localización y extensión de la cavidad centromedular. Mediante técnicas de microcirugía, la cavidad fue rellenada bajo el microscopio quirúrgico con una suspensión de células madre mesenquimales. Para obtener el tejido donante para el implante, cultivos de células madre correspondientes a un cultivo primario de células mesenquimales o a un primer pase (P<sub>1</sub>) eran tratados con 10 microgramos/ml de bisbenzimidá (Hoechst 33342. Baron-Van Evercooren y cols, 1991) durante 30 minutos a 37°C y levantados en condiciones estériles por digestión enzimática con tripsina 0.25%/1mM EDTA durante 4-5 minutos a 37°C. Tras este periodo de incubación la tripsina era inactivada con 6 ml de medio alfa-MEM completo. Las células obtenidas tras ser centrifugadas a 1200 rpm durante 15 minutos eran lavadas al menos dos veces con medio alfa-MEM/10%FBS mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos cada lavado. Finalmente, el “pellet”

obtenido era diluido en medio alfa-MEM/sin FBS y sometido a recuento mediante el test de viabilidad de azul tripán. La suspensión celular obtenida se resuspendió en 500 microlitros de medio alfa-MEM/ sin FBS y fue sometida a recuento celular en una cámara de Neubauer mediante el test de azul tripán.

Las células mesenquimales fueron inyectadas intramedularmente mediante un microinyector, a una concentración final variable en los diferentes grupos experimentales, entre 3 y 6 x 10<sup>6</sup> células madre mesenquimales totales por cada animal. Después del implante, el punto de inyección fue sellado con gel de fibrina.



*Figura 4.- Técnica de microinyección de células madre adultas mesenquimales en las cavidades centromedulares postraumáticas, con ayuda de un sistema de estereotaxia que acopla un microinyector. La técnica de microinyección dura aproximadamente una hora en cada animal, al objeto de evitar la salida del volumen inyectado.*

En los animales control se realizó el mismo procedimiento, pero inyectando el mismo volumen de medio alfa-MEM. Todos los animales (trasplantados y controles) fueron sometidos diariamente a técnicas de rehabilitación consistentes en la movilización pasiva durante 15 minutos de las extremidades inferiores desde la primera semana después de la lesión. Semanalmente tras la lesión medular, todos los animales fueron periódicamente evaluados para comprobar su recuperación motora usando la escala BBB, de Basso, Beattie y Bersnahan (Basso y cols, 1995). Esta valoración fue llevada a cabo diariamente por dos investigadores diferentes, que no conocían el grupo experimental al que pertenecían los animales a valorar.



Los animales se dejaron evolucionar hasta 1 año después del trasplante, sacrificándose varios de ellos, en determinados momentos evolutivos, al objeto de conocer las modificaciones histológicas progresivas en la médula espinal traumatizada, tras el implante de las células madre adultas. Como paso previo al implante de las células madre, para su identificación tisular, éstas fueron marcadas en cultivo, con bisbenzimidida. Además de este marcaje, previamente al implante de las células madre adultas, éstas fueron marcadas por medio de una transducción retroviral, introduciendo en ellas el gen de la beta-galactosidasa de E. Coli, al objeto de identificar luego inmunohistoquímicamente la evolución morfológica de dichas células. Se utilizó para ello el vector retroviral pRV LacZ con una envuelta proteica VSVG (glicoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular) que le confiere un tropismo celular muy amplio sin posibilidad de infectar células humanas. El título del sobrenadante retroviral fue de  $3.75 \times 10^6$  UI/ml (unidades infectivas por ml). Como detalles técnicos, en el momento de la infección, se descongela el vial de partículas retrovirales en un baño a 37°C y se agita suavemente. A continuación, se añade 8 µl del vial de adyuvante y se mezcla bien pipeteando suavemente. Se quita el medio de cultivo a las células y se añade la alícuota de partículas a las células (50µl por cada cm<sup>2</sup> aditivos incluido). Se incuba la muestra a 37°C durante 4 a 6 horas (máximo toda la noche) y luego se dejan crecer las células en el medio habitual durante mínimo 48 horas antes de analizar la expresión del transgen marcador.

En un grupo de 5 animales se procedió al marcaje de las células madre adultas con Indio-111 al objeto de conocer si esta técnica podía determinar in vivo la distribución de las células inyectadas. En 2 de ellos las células madre se inyectaron iv para conocer si alcanzaban el sitio de lesión en comparación con los que recibieron la inyección intralesional de células madre.

El manejo de los animales obedeció en todo momento a lo estipulado por la legislación vigente respecto al uso y cuidados de los animales de laboratorio.

Desde el punto de vista de estudios morfológicos, a intervalos variables de tiempo evolutivo, se sacrificaron animales para estudiar las modificaciones de la cavidad centromedular postraumática. Se realizaron técnicas histológicas convencionales, así como estudios inmunohistoquímicos para detectar axones conteniendo neurotransmisores característicos de fibras acendentes o descendentes (serotonina, dopamina-B-hidroxilasa, etc) y técnicas para detectar las células madre marcadas (bisbenzimidida por fluorescencia, y detección inmunohistoquímica de B-galactosidasa en animales que recibieron células madre con transfección génica).

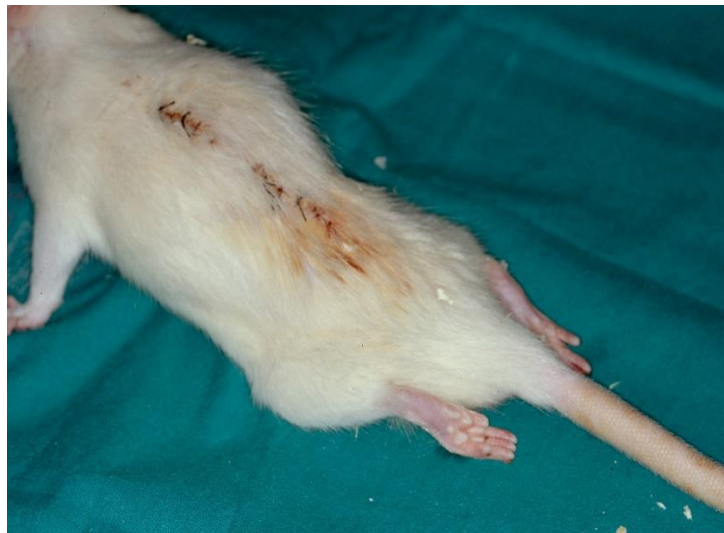
En 10 animales con evolución superior al año, se inyectó, en corteza motora cerebral, en condiciones estereotáxicas, biotindextranamina, como trazador axonal

que marca los axones motores de la vía piramidal, al objeto de poder conocer si estos axones, en un determinado momento evolutivo, son capaces de descender por debajo de la zona de lesión, lo que indicaría una regeneración tisular efectiva tras la técnica de reconstrucción medular con células madre adultas.

## RESULTADOS OBTENIDOS EN ROEDORES

---

Con el modelo experimental de lesión traumática medular utilizado, todos los animales experimentan una paraplejia completa tras la contusión. Aproximadamente 1 semana después del trauma comienza a objetivarse una importante atrofia de miembros posteriores.



*Figura 5.- Rata parapléjica tras la lesión*

La valoración de la función motora, de acuerdo a la escala BBB, mostró en todos los animales traumatizados un valor 0, desde el momento de la lesión hasta 3 meses después, momento en que se consideró, de acuerdo con observaciones previas en nuestro laboratorio, que estábamos ante una paraplejia crónica irreversible, procediéndose entonces a la segunda intervención de implante intralesional de las células madre adultas.

Tras el implante de células madre mesenquimales, la valoración de los animales que recibieron el implante comenzó a modificarse a partir de las 2 semanas del implante, con clara diferencia a partir de la tercera semana respecto del grupo de animales que recibieron inyección intramedular tan solo de medio alfa-MEM, los cuales permanecieron sin ningún tipo de recuperación motora (valor 0 de la escala BBB). El seguimiento de los animales, desde el punto de vista funcional, se hizo hasta 1 año

después del trasplante en varios grupos experimentales, todos ellos con más de 10 animales por grupo, y además, en animales adicionales se estudió, tras su sacrificio, la médula espinal al objeto de valorar las modificaciones progresivas de la zona de necrosis centromedular, donde se administraron las células madre adultas mesenquimales.

Tras el sacrificio de los animales, los animales del grupo control, independientemente de cuál fuera el tiempo de evolución, mostraron histológicamente el típico aspecto de una lesión quística centromedular secundaria a una necrosis postraumática, hecho bien conocido en la patología traumática de la médula espinal. Sin embargo, los animales que recibieron el implante de células madre mostraron una tabicación de la cavidad centromedular, a expensas de cordones de células alargadas, verosíblemente representando las células inyectadas o elementos proliferados a partir de ellas. En algunas zonas se apreció cómo estas estructuras o bandas de tejido tendían a unir, en la periferia medular, los dos segmentos medulares limítrofes con la cavidad centromedular. Los estudios de fluorescencia permitieron confirmar, mediante el marcaje de las células inyectadas con bisbenzimidá, que las células implantadas perduran en el tejido medular, al menos un mes tras su inyección intralesional. Igualmente, el marcaje con beta-galactosidasa permitió en todos los casos la identificación de las células madre.

Un hecho a destacar, ya al mes de la administración de células madre, fue la presencia de acúmulos de células formando estructuras rosetoides, en íntima relación con estructuras endimarias de la médula lesionada y que se identificaron como células verosíblemente endimarias. Entre estas células, presentes en la cavidad centromedular, se observaron elementos celulares de aspecto neuronal.

Cuando algunos cortes histológicos se procesaron para marcaje del antígeno de proliferación Ki-67 se apreció una intensa actividad proliferativa en células presentes en la cavidad centromedular y sobre todo en las bandas de tejido que se entrecruzaban en dicha región.

Los animales que se dejaron evolucionar hasta un año después del implante de células madre mesenquimales mostraron un mayor índice de recuperación funcional, alcanzando casi el valor máximo de la escala BBB, y al ser sacrificadas y estudiada histológicamente la zona del implante, se apreció una diferenciación e integración de las células trasplantadas, formándose un puente tisular que facilita el paso de axones en regeneración. En cualquier caso, los marcadores de diferenciación neuronal y glial aplicados como comarcaje sobre células positivas a beta-galactosidasa de E. Coli (por lo tanto, identificables como las células madre previamente implantadas) mostraron, sin ningún tipo de duda, que las células

madre mesenquimales habían sufrido una diferenciación hacia neuronas y células gliales.

Los estudios histológicos en animales a los 6 meses del implante mostraron progresivas imágenes de relleno de la cavidad centromedular, estableciéndose ya en este periodo auténticos puentes tisulares entre ambos cabos de la médula traumatizada.

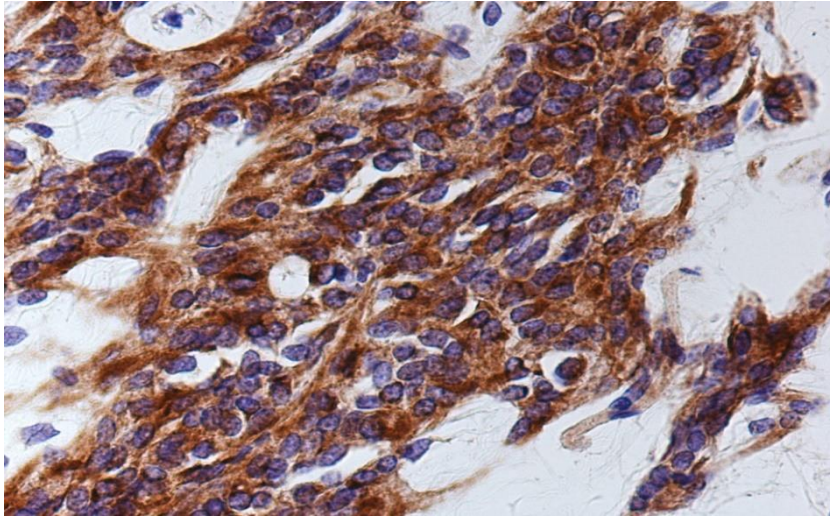


Figura 6. Zona de lesión traumática. Animal que se dejó evolucionar 1 mes tras el implante de CMM. Se observa el marcaje de las bridas que rellenan la cavidad traumática medular con beta-galactosidasa, lo que permite confirmar el origen de estas bridas que inician un puente tisular a partir de las células madre.

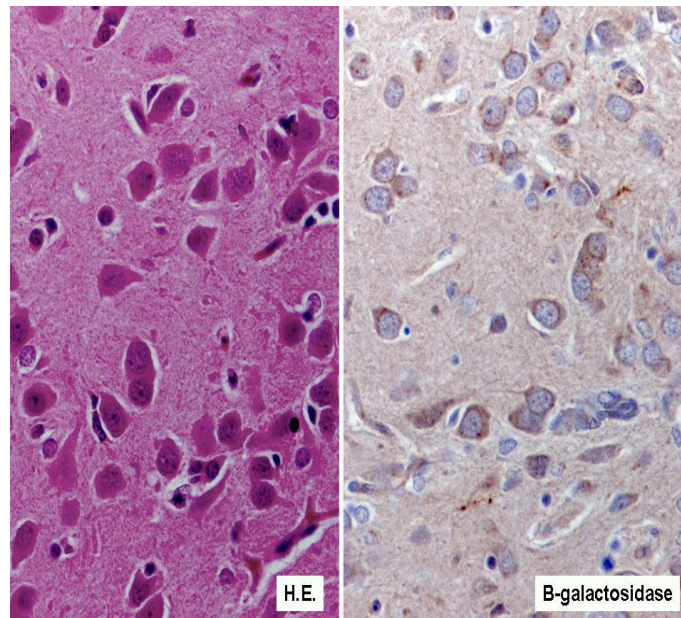


Figura 7.- A la izda.: Tejido formado en la cavidad traumática, al año del implante. Clara morfología neuronal de la mayor parte de las células. A la derecha: Marcaje con beta-galactosidasa de las células maduras de morfología neuronal, lo que confirma su transdiferenciación a partir de las CM previamente implantadas.

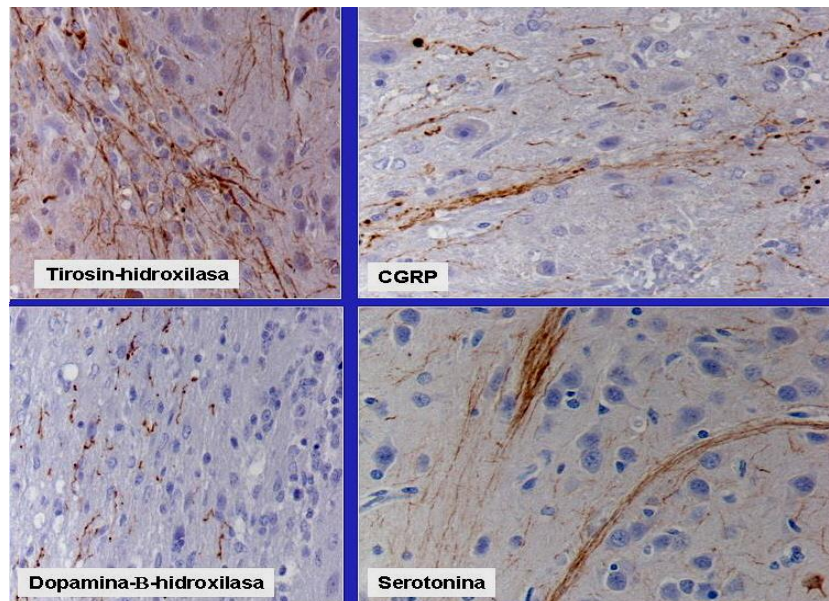


Figura 8.- Identificación inmunohistoquímica de diferentes sistemas de axones, que atraviesan el tejido nervioso neoformado. Axones con marcaje tirosin-hidroxilasa y axones marcados por tener el péptido relacionado con el gen de la calcitonina son ascendentes, sensoriales, mientras que axones que marcan por tener dopamina-beta-hidroxilasa y serotonina corresponden a vías descendentes del rafe y nucleus ceruleus. Estas técnicas muestran que el tejido neoformado por el trasplante de células madre constituye un puente tisular por el que pueden discurrir todo tipo de axones ascendentes y descendentes.

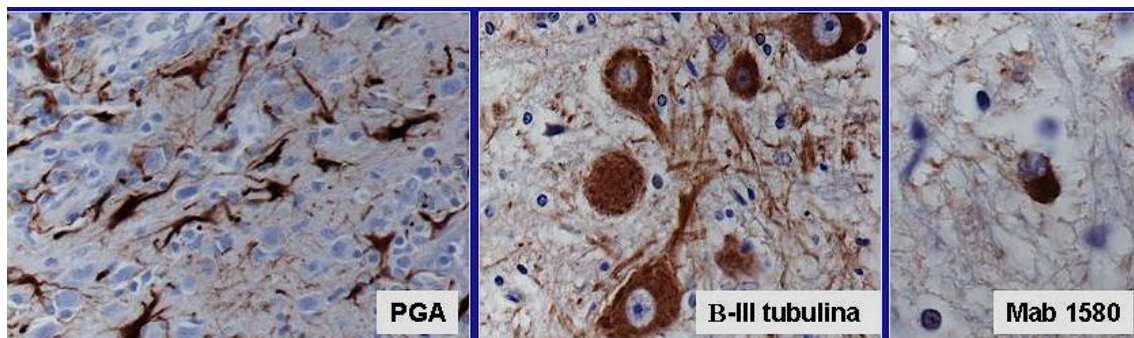


Figura 9.- Identificación inmunohistoquímica de astrogliá (PGA) neuronas maduras (B-III tubulina) y oligodendroglía (Mab 1580) en el tejido nervioso neoformado. Un análisis cuantitativo revela que en el tejido neoformado por las células madre adultas mesenquimales existe una transdiferenciación de éstas con porcentajes de 35 % neuronas, 45 % astrogliá y 6 % oligodendroglía. Se identifican también un 3 % de células nestina positivas, posiblemente, células madre neurales endógenas y un pequeño porcentaje de células sin identificar, entre las que pueden estar células relacionadas con la angiogénesis.

## DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ROEDORES

Los resultados descritos mostraron que los animales con una paraplejía crónica postraumática experimentan una clara recuperación motora, de forma precoz tras

el implante intralesional de una suspensión de células madre mesenquimales. Esta recuperación parece ser progresiva, tal como se desprende de las observaciones recogidas durante la evolución a largo plazo de los animales que fueron sacrificados al año del implante intralesional de células madre.

Los estudios morfológicos de los animales que recibieron el implante de células madre mesenquimales mostraban que existe una tendencia progresiva a la ocupación de la zona quística centromedular por bandas de células alargadas que verosíblemente están constituidas, al menos en parte, por las células trasplantadas, cuya presencia puede ser confirmada mediante el marcaje de estas células, ya sea con bisbenzimidida o mediante inmunohistoquímica con la reacción a la beta-galactosidasa tras transfección.

En el curso de los meses siguientes al trasplante de células madre se va rellenando progresivamente la cavidad centromedular, observándose ya hacia los 5-6 meses puentes tisulares que unen ambos cabos de la médula traumatizada. El marcaje por medio de betagalactosidasa demuestra que este tejido proviene de las células trasplantadas y está formado por neuronas maduras (35 % de las células), astrogliá (35 %), oligodendroglía (6 %), células nestina-positivas, que pueden corresponder a células madre neurales endógenas, y un porcentaje de células sin identificar.

El tejido nervioso neoformado no presenta una zona de cicatriz fibrosa en la interfase con el tejido medular residual, lo que es evidente cuando se estudia en comparación con lo que muestra la tinción del tricrómico de Masson en los bordes de las cavidades centromedulares traumáticas de los animales control. A través de esta interfase con escasa reacción cicatricial pasan sin dificultad sistemas axonales ascendentes y descendentes, incluyendo fibras motoras que proviene de la corteza cerebral, tal como muestra el estudio de trazadores con biotin-dextranoamina.

El principal problema que surgía ante estos resultados es conocer los mecanismos por los cuales se produce la recuperación funcional de los animales que recibieron el implante de células madre mesenquimales, al menos en un momento anterior a los seis meses tras el trasplante, que es cuando ya se identifican puentes que conectan ambos segmentos medulares previamente separados por la cavidad quística postraumática. Una hipótesis razonable, ya señalada por Chopp y cols (2000) es que tal vez las células mesenquimales expresan factores de regeneración o activan mecanismos compensadores, e incluso la proliferación de células madre endógenas de la médula traumatizada. Esta posibilidad parece más acorde con el momento precoz en que se inicia tras el trasplante la recuperación funcional y con el hallazgo de una posible proliferación de células ependimarias, actualmente consideradas como las principales células madre endógenas de la médula espinal (Johansson y cols, 1999).

Al año del implante, existe una mayor recuperación funcional de los animales y el estudio histológico de la médula espinal previamente traumatizada reveló una clara reconstrucción anatómica y la instauración de un puente pasivo entre ambos segmentos medulares, a cuyo través pasan sin dificultad axones. En este tiempo de evolución la inmunotinción para beta-galactosidasa permitió comprobar que las células madre habían evolucionado a un fenotipo neuronal o astrogial, integrándose en el tejido huésped.

Desde el punto de vista de posible aplicación clínica de estos estudios, parece interesante el hecho de que con el presente estudio pudimos confirmar la conveniencia de que los implantes de células madre se realicen de forma diferida respecto del momento de la lesión, observación ya hecha por autores previos (Chopp y cols, 2000; Hofstetter y cols, 2001) quienes admiten que de forma precoz existe en el tejido lesionado un cúmulo de factores tóxicos, como radicales de oxígeno y enzimas líticas, que hace difícil la acción de fenómenos regenerativos. En cualquier caso, es obvio que la aplicación a humanos de estas técnicas exige un tratamiento diferido, ante la posibilidad de que en las semanas siguientes al traumatismo medular se aprecien, de forma espontánea y tras remitir el edema acompañante a una posible lesión incompleta, signos de recuperación funcional.

En el caso de utilización clínica de la técnica parece evidente que se trata de un procedimiento sencillo, sin los riesgos y complicaciones inherentes a las técnicas en desarrollo clínico-experimental, de trasplantes intramedulares de tejido nervioso fetal (Wirth y cols, 2001; Zurita y cols., 2000, 2001), ya que es posible la utilización y manipulación *in vitro*, previamente al implante, de células autólogas, obtenidas por punción de médula ósea del propio paciente parapléjico. Con las técnicas de neuroimagen disponibles, parece factible además proceder al implante de células madre en las cavidades centromedulares por medio de punción percutánea, lo que podría incluso facilitar la metodología a realizar.

Una de las cuestiones que parecía quedar resuelta con estos hallazgos es el hecho de que no parece necesario, como algunos autores defienden, proceder a una diferenciación *in vitro*, hacia un fenotipo neuronal, de las células madre mesenquimales. De hecho, nuestros resultados muestran que el efecto de recuperación funcional se logra tras el implante de células sin diferenciación, tal vez porque su mecanismo de actuación sea la liberación de factores tróficos capaces de activar los mecanismos de reparación endógena medular, o bien porque las células trasplantadas se diferencien *in vivo*, tras el trasplante y como consecuencia en un entorno tisular adecuado, hacia el fenotipo neural necesario.

## ESTUDIOS REALIZADOS EN EL CERDO ADULTO. MODELO DEL “MINIPIG” PARAPLÉJICO

---

Al objeto de confirmar los resultados mostrados en ratas Wistar, se utilizaron más de 60 cerdos adultos enanos (minipigs), sobre los que se empleó la misma técnica de trasplante de células madre adultas mesenquimales, obtenidas de su propia médula ósea. El modelo de paraplejia completa y crónica en el cerdo adulto, aportado a la literatura por nuestro grupo (Zurita et al, 2012) es extraordinariamente complejo, por los cuidados que se les debe proporcionar al objeto de lograr su supervivencia a largo plazo, lo que limita el número de animales que pueden ser estudiados en diseños experimentales como el que hemos planteado. Resulta muy problemática la rehabilitación que debe ser hecha en estos animales, lo que nos ha obligado a un diseño específico de sillas de ruedas, que nos ha permitido someter a los animales parapléjicos, controles y tratados, a un protocolo diario de rehabilitación, antes y después del trasplante de células madre. Esta rehabilitación fue mantenida hasta el momento de sacrificar los animales, lo que se hizo en periodos de tiempo variables entre 3 meses y 1 año tras la lesión.

La lesión traumática también presenta dificultades para lograr una lesión estandarizada, por lo que, tras estudios preliminares, llegamos a la conclusión de que una lesión de compresión mantenida sobre la médula expuesta, por medio de la aplicación sobre la duramadre de 2 clips utilizados para el clipaje de aneurismas cerebrales consigue los mismos efectos clínicos y anatomopatológicos que las lesiones traumática logradas en el modelo experimental de paraplejia traumática en la rata Wistar adulta.

Por el contrario, en el cerdo se pueden realizar con mayor facilidad estudios neurofisiológicos (potenciales evocados motores y somatosensoriales), por lo que la realización de estos estudios fue uno de los motivos de utilizar el modelo del cerdo adulto.

En el estudio realizado en cerdos, hemos marcado las células madre con Bromouridina, al objeto de su identificación posterior en cortes histológicos, tras el sacrificio de los animales. La evolución de los animales fue suficiente para objetivar una clara recuperación funcional motora y sensitiva, a partir de los 2 meses del trasplante intramedular de células madre.



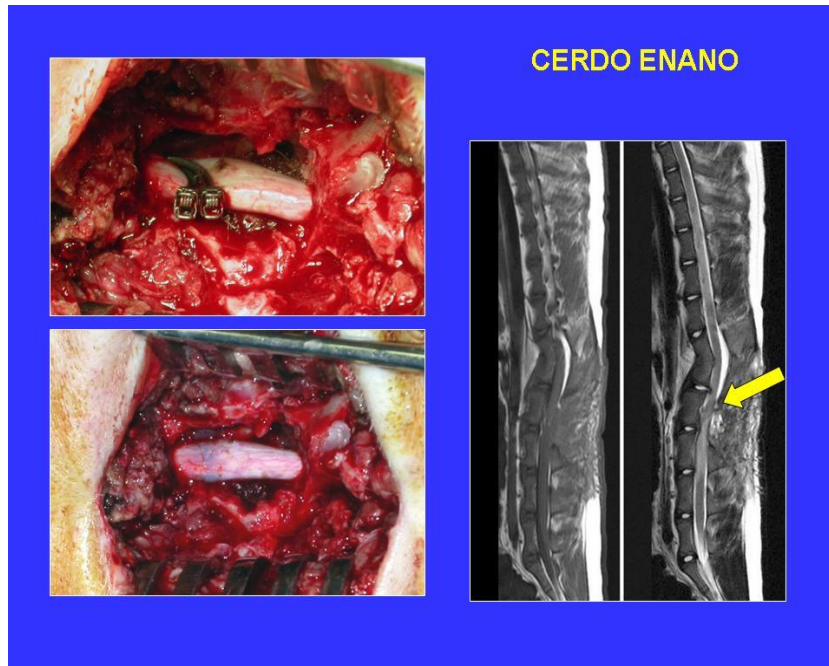


Figura 10.- Modelo experimental de paraplejia traumática en el cerdo adulto. A la izquierda se muestra la técnica quirúrgica para realizar la lesión, mediante compresión durante 30 minutos de la médula con 2 clips de aneurisma. Abajo, a la izquierda, se aprecia la lesión realizada. A la derecha se observa cómo se puede estudiar la lesión efectuada, por medio de RM. La flecha muestra la lesión medular, a los 5 días de haberse producido la compresión.



Figura 11.- Cuidados de rehabilitación, en los cerdos parapléjicos, en los primeros días tras el trasplante intramedular de células madre mesenquimales adultas, obtenidas del estroma de su propia médula ósea.

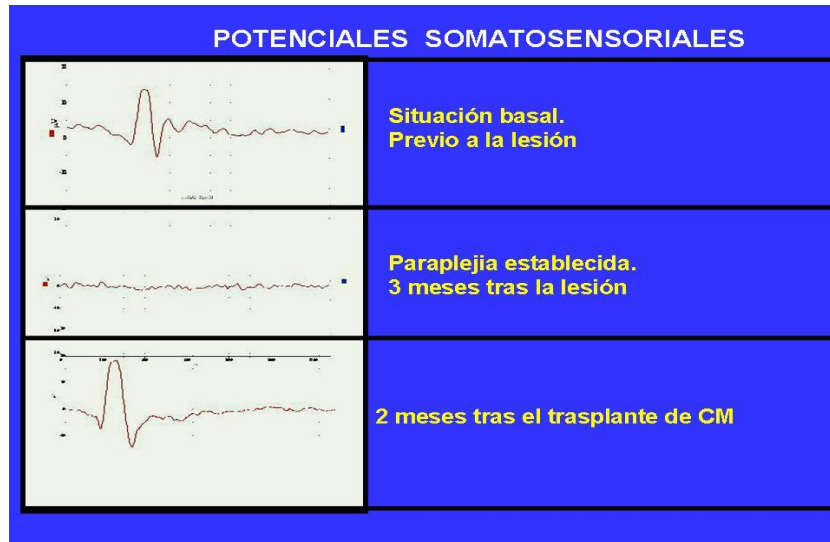


Figura 12.- Estudios neurofisiológicos (potenciales somatosensoriales) que demuestran cómo a los 2 meses tras el trasplante, coincidiendo con evidentes signos de recuperación funcional clínica, se aprecia la reaparición de potenciales somatosensoriales, los cuales habían desaparecido tras la lesión traumática.

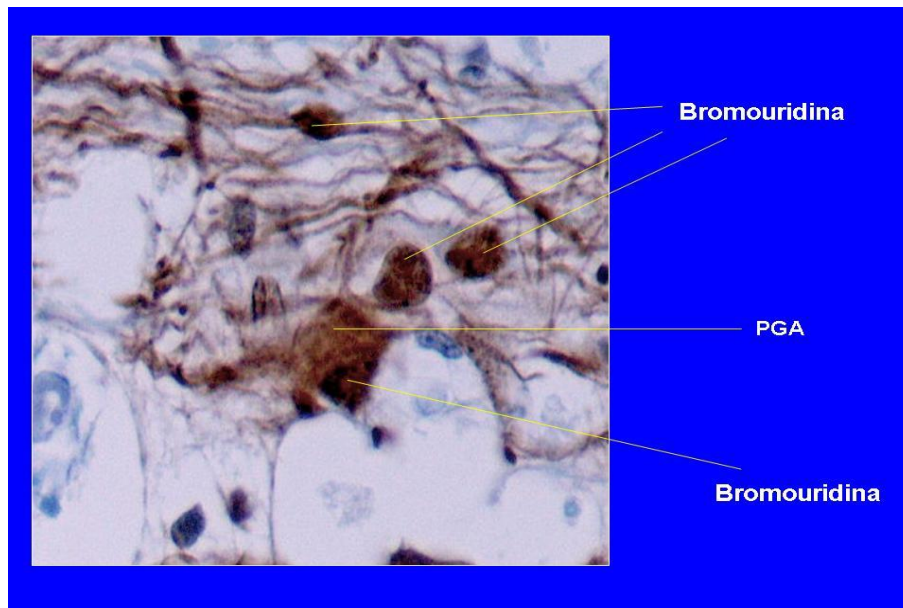
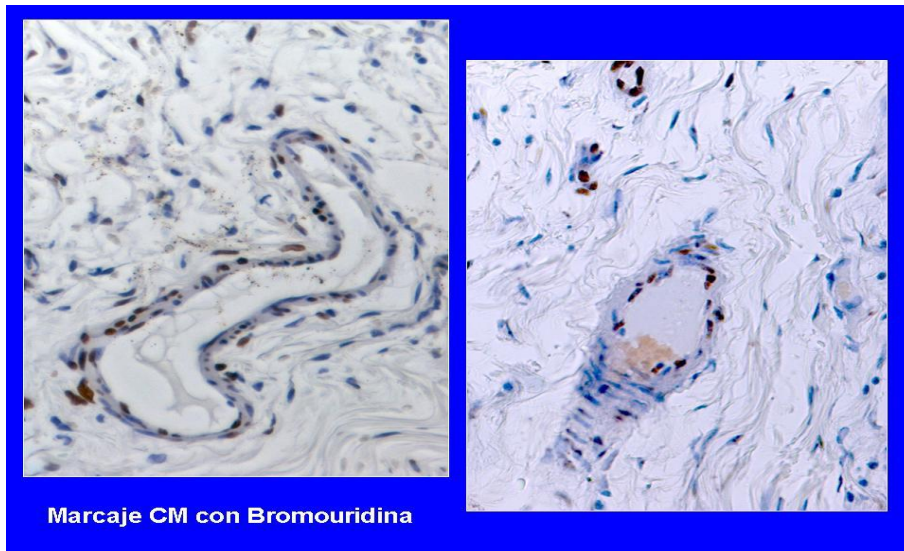


Figura 13.- Cerdo adulto. Estudios inmunohistoquímicos para detección de bromo-uridina. Tres meses tras el trasplante en un animal previamente parapléjico, con evidencias de recuperación funcional en el momento de ser sacrificado, se observan núcleos marcados, correspondientes a las células madre previamente marcadas con bromo-uridina. Un co-marcaje inmunohistoquímico permite detectar PGA en células con núcleo marcado, lo que indica una transdiferenciación de las células madre trasplantadas hacia células astrogliales.



*Figura 14. Cerdo adulto. Estudios inmunohistoquímicos para detección de bromo-uridina. Tres meses tras el trasplante en un animal previamente parapléjico, con evidencias de recuperación funcional en el momento de ser sacrificado, se observan núcleos marcados, correspondientes a las células madre previamente marcadas con bromo-uridina. Se observa en estas imágenes cómo las células marcadas se pueden encontrar en la pared de los vasos sanguíneos, lo que confirma los hallazgos obtenidos en roedores, en el sentido de que las células madre trasplantadas pueden diferenciarse no sólo hacia células nerviosas, sino que igualmente organizan y promueven la angiogénesis en el tejido neoformado.*

Los resultados que se muestran en las imágenes precedentes confirman los resultados clínico-experimentales previamente obtenidos en roedores, utilizando ya mamíferos superiores adultos y permiten de esta forma plantear la posible aplicación terapéutica en clínica humana de estas nuevas técnicas de terapia celular. La experiencia utilizada con cerdos muestra una clara recuperación funcional presente ya a los 2 meses tras el trasplante.

La dificultad de este modelo condiciona la evolución a largo plazo de los animales trasplantados. Sin embargo, nuestra experiencia es que a los 2-3 meses después del trasplante, existe ya una clara evidencia de que se inicia el relleno de la cavidad centromedular, con imágenes histológicas similares a las que encontramos en las fases iniciales de regeneración nerviosa en la rata trasplantada.

Al igual que ocurre en roedores, en el cerdo pudimos encontrar evidencias de que existe una clara recuperación funcional en un momento anterior a aquel en el cual se observa un claro puente tisular y relleno completo de la cavidad centromedular postraumática. Esta observación sugiere que el trasplante de células madre mesenquimales actúa, en una primera fase, liberando factores tróficos capaces de estimular la regeneración funcional del tejido nervioso lesionado, a expensas de circuitos anatómicamente preservados, y en una segunda fase, logrando la regeneración morfológica del tejido nervioso, a expensas de la formación de un nuevo tejido cuyo origen radica en la transdiferenciación de las células madre

mesenquimales previamente trasplantadas. En este nuevo tejido, al igual de lo que hemos observado en roedores, las células madre evolucionan no solo hacia elementos nerviosos, sino que igualmente intervienen en fenómenos de angiogénesis, generando nuevas estructuras vasculares.

La demostración de que reaparecen potenciales evocados somatosensoriales de forma precoz tras el trasplante, coincidiendo con signos clínicos de recuperación funcional de los animales, aporta evidencias objetivas a favor de esta interpretación, puesto que en esta fase aún no se constata histológicamente la formación de un puente tisular capaz de permitir el paso bidireccional de axones en regeneración.

## RESUMEN Y PRINCIPALES CONCLUSIONES DE LOS ESTUDIOS PRECLÍNICOS

---

Resumiendo nuestra experiencia preclínica, podemos señalar que la administración de células madre mesenquimales (MSC) en situación de paraplejia crónicamente establecida, va seguida de claros signos de recuperación neurológica, alcanzándose al año una recuperación motora prácticamente total en más del 60 % de los casos, lo que se asocia a signos de regeneración de tejido nervioso a nivel de la zona previamente lesionada (Zurita y Vaquero, 2006). Tras confirmar la eficacia del trasplante de células madre para lograr recuperación motora de los animales parapléjicos, nos planteamos si también podría ser eficaz una administración de estas células por vía sistémica, sobre todo teniendo en cuenta algunas publicaciones que señalaban cómo la administración intravenosa de MSC puede revertir déficits funcionales en ratas sometidas a un traumatismo craneoencefálico (Mahmood et al, 2001). Como un primer paso, marcamos las MSC con bisbenzimidida, o bien con Indio-111, y realizamos estudios para comprobar la distribución de las células marcadas tras su administración sistémica por vía intravenosa. Los resultados que obtuvimos mostraron que tras su administración intravenosa, las MSC marcadas colonizaban órganos de alta perfusión, como el bazo, hígado o riñón, pero no alcanzaban de forma significativa la zona de lesión medular. Estos estudios nos permitieron aportar a la literatura la utilidad del marcaje isotópico con Indio-111 para estudiar la distribución de MSC tras su administración en procedimientos de terapia celular, y nos llevaron a la conclusión de que la administración sistémica de MSC no permite que estas células lleguen en un número significativo a las zonas de lesión traumática medular, al menos en una fase de lesión medular crónicamente establecida (De Haro et al (2005). En un estudio posterior valoramos la recuperación motora de animales parapléjicos tras la administración sistémica o intralesional de MSC, lo que nos permitió confirmar la evidente superioridad de la administración local frente a la administración sistémica (Vaquero et al, 2006). Los buenos resultados obtenidos en

roedores fueron reproducidos en cerdos adultos “minipig” con una paraplejía crónicamente establecida (Zurita et al, 2008 y 2012), lo que permitió suponer que esta técnica puede ser igualmente útil en humanos y nos llevó a la prueba de concepto necesaria para obtener de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) la autorización para realizar en nuestro país el primer estudio clínico de terapia celular enfocado al tratamiento de la paraplejía traumática, crónicamente establecida. De forma paralela, nuestro equipo de investigación diseñó el primer medicamento humano de terapia celular autorizado en España, como medicamento en fase de investigación clínica, indicado para el tratamiento de lesiones traumáticas de la médula espinal (medicamento NC1, PEI nº 12-141, autorizado por Resolución de la AEMPS de fecha 22-2-2013).

Las principales conclusiones que obtuvimos con nuestros estudios preclínicos fueron las siguientes:

- La obtención de células madre mesenquimales de médula ósea es un procedimiento sencillo, que permite su manipulación *in vitro* y la preparación de suspensiones para su implante en lesiones traumáticas del Sistema Nervioso.
- La administración experimental de una suspensión de células madre mesenquimales, obtenidas del estroma de médula ósea, en lesiones postraumáticas del Sistema Nervioso, al menos en lesiones traumáticas de la médula espinal, se asocia a una rápida recuperación de función motora que es progresiva y se mantiene a largo plazo.
- Las células madre mesenquimales trasplantadas se integran en el tejido medular traumatizado y pueden ser identificadas a largo plazo como células que en este microambiente específico, se han transdiferenciado preferentemente hacia un fenotipo neuronal y glial.
- El tejido nervioso neoformado tras el implante de células madre mesenquimales adultas permite el paso, como puente pasivo, de sistemas de fibras ascendentes y descendentes, incluyendo axones de la vía piramidal.
- Estas observaciones se confirmaron tanto en roedores (rata Wistar adulta) como en mamíferos superiores (cerdo adulto).
- Tras la realización de estos estudios preclínicos, la técnica del implante intralesional de células madre adultas mesenquimales, autólogas, se configuraba como una prometedora perspectiva en clínica humana, con potencial aplicación inmediata en pacientes con paraplejía crónica de origen traumático.

## APLICACIÓN CLÍNICA EN HUMANOS

---

Como consecuencia de la experiencia aportada a la literatura por nuestro propio grupo de investigación y por otros investigadores, en los últimos años se ha iniciado la aplicación de diversas técnicas de terapia celular a pacientes con lesión medular traumática. Los primeros ensayos clínicos se han hecho utilizando células madre que incluyen tanto MSC como células madre hematopoyéticas y han confirmado la ausencia de efectos secundarios significativos (Park et al, 2012; Sykova et al, 2006; Yoon et al, 2007). Un estudio clínico preliminar con una serie relativamente alta de pacientes parapléjicos sometidos al implante intralesional de células mononucleares de médula ósea fue publicado ya en el año 2008, señalándose, un año tras el procedimiento, evidente recuperación en sensibilidad, motilidad y control de esfínteres (Geffner et al, 2008). No obstante, en el estado actual de esta línea de investigación, no están claras las ventajas de utilizar exclusivamente células mesenquimales troncales adultas autólogas para estos trasplantes, tal como diversos grupos hemos hecho en los estudios experimentales preclínicos (Chopp et al, Hofstetter et al, 2002; Zurita y Vaquero, 2006; Vaquero y Zurita, 2009; Vaquero et al, 2006; Ohta et al, 2004; Bakshi et al, 2006; Himes et al, 2006; Parr et al, 2007), o bien de utilizar, como se ha hecho en la mayor parte de las primeras experiencias clínicas en humanos, una mezcla de células estromales y otras células mononucleares de médula ósea (Sykova et al, 2006; Yoon et al, 2007; Deda et al, 2008). Las ventajas de una u otra de ambas opciones ha sido discutida extensamente en recientes publicaciones de nuestro propio grupo de investigación (Vaquero y Zurita, 2009 y 2011). En este sentido, la experiencia obtenida por nuestro grupo a nivel preclínico y el hecho de que entre la fracción de progenitores mononucleares de médula ósea se incluyen células programadas para su diferenciación hematopoyética, que teóricamente son de dudosa utilidad para la terapia propuesta, hacen aconsejable centrarnos en la utilización de una población pura de MSC.

Teniendo en cuenta que las MSC representan menos del 0.01 % de las células de la médula ósea, su empleo en protocolos de terapia celular requiere manipular estas células en instalaciones de alta seguridad biológica (Salas blancas o salas GMP) para expandir las células y obtener un número suficiente antes de realizar el trasplante, lo que conlleva una cierta complejidad técnica y posiblemente éste sea el principal argumento para la utilización, en clínica, de células madre de médula ósea total, incluyendo la fracción de células madre hematopoyéticas. Sin embargo, las MSC tienen la ventaja de su gran especificidad para lograr su transdiferenciación en el seno del tejido huésped, su gran facilidad de expansión, teniendo en cuenta que la eficacia del trasplante parece ser dosis-dependiente, y, por último, su baja antigenicidad, lo que puede permitir, al menos teóricamente, el empleo de trasplantes alogénicos de células troncales mesenquimales en clínica humana.

En cualquier caso, existen aún evidentes incógnitas acerca de los mecanismos por los cuales este tipo de terapia celular consigue la recuperación neurológica, tanto de animales experimentales como de los pocos pacientes en los que se ha ensayado hasta ahora. En los estudios experimentales realizados, llama la atención que la recuperación funcional de los animales con lesión medular establecida se inicia antes de que se produzca una regeneración tisular capaz de rellenar completamente la cavidad centromedular traumática y exista un puente capaz de permitir el paso de axones ascendentes y descendentes (Zurita y Vaquero, 2004 y 2006; Zurita et al, 2008). Por lo tanto, es obvio que tras el trasplante deben existir diversos procesos de reparación, incluyendo la liberación de factores neurotróficos por las células madre trasplantadas (Chen et al, 2005), o la activación de mecanismos endógenos de la médula espinal, capaces de restaurar parcialmente funciones neurológicas previamente abolidas. Entre ellos, una activación de la neurogénesis endógena y una modulación de la apoptosis celular parecen ser mecanismos determinantes, tal como ha sido confirmado por nuestro grupo en modelos experimentales de daño cerebral (Bonilla et al, 2009; Otero et al, 2012).

Basándonos en los resultados experimentales realizados por nuestro grupo, que sugieren la conveniencia de llevar al sitio de lesión una gran cantidad de células donantes, nuestros esfuerzos deben ir encaminados a lograr la mayor supervivencia posible de las MSC, una vez trasplantadas y sugieren que la administración de varias dosis de MSC podría ser beneficiosa. En este sentido, diversos estudios muestran que las células madre derivadas de la médula ósea pueden alcanzar las zonas de lesión centromedular traumática tras ser depositadas en el espacio subaracnoideo (Ohta et al, 2004; Bakshi et al, 2006; Himes et al, 2006; Satake et al, 2004; Bakshi et al, 2004), una observación que debe ser tenida en cuenta a la hora de aplicar estas técnicas en pacientes, por cuanto que permitiría una forma de administración sencilla, sin los riesgos de una eventual cirugía para el implante celular en las zona de daño traumático y que ha sido considerada a la hora de diseñar el protocolo de nuestros primeros estudios clínicos.

Desde el punto de vista del momento de la aplicación clínica de MSC en lesiones medulares, hemos contemplado la conveniencia de que los implantes de células madre se realicen de forma diferida respecto del momento de la lesión, ante la posibilidad de que en las semanas siguientes al traumatismo medular se aprecien, de forma espontánea y tras remitir el edema acompañante a una posible lesión incompleta, signos de recuperación funcional que podrán ser interpretados erróneamente como debidos a la terapia celular. Por otra parte, la administración de MSC autólogas es un procedimiento que no plantea la conveniencia o necesidad de inmunosupresión, lo que presenta grandes ventajas, teniendo en cuenta las frecuentes infecciones urinarias que presentan los pacientes con lesión medular

crónicamente establecida (Vaquero y Zurita, 2011; Park et al, 2012; Pal et al, 2009; Saito et al, 2008 y 2012; Jiang et al, 2013; Mendonça et al, 2014). Con las técnicas de neuroimagen disponibles, parece factible, además, conocer las modificaciones morfológicas de la médula espinal tras el tratamiento, y con las técnicas neurofisiológicas al uso, podemos conocer datos objetivos de eficacia funcional, que pueden corroborar los exámenes clínicos de los pacientes.

En cuanto a la administración de células madre adultas de médula ósea en el espacio subaracnoideo para tratar de mejorar los déficits funcionales de la lesión medular en pacientes, es una estrategia planteada por diferentes grupos de investigación, tras comprobarse en modelos animales la superioridad de esta vía de administración respecto de la administración sistémica y tras comprobarse en diversos estudios preclínicos que las células inyectadas en espacio subaracnoideo alcanzan la zona de lesión medular y pueden ser eficaces para lograr recuperación funcional en animales parapléjicos, concretamente en ratas, conejos y perros (Satake et al, 2004; Liu et al, 2008; Li et al, 2010; Nishida et al, 2011). La experiencia experimental de nuestro grupo en un modelo de paraplejia crónica en cerdos adultos tipo “minipig” (Zurita et al, 2012) permitió confirmar estas observaciones, demostrando, además que las células madre mesenquimales adultas infundidas en espacio subaracnoideo alcanzan la zona de lesión a las 48 horas de su administración y son capaces de lograr mejoría funcional en cerdos adultos con paraplejia crónicamente establecida (Vaquero y Zurita, 2009; Zurita et al, 2013).

Desde el punto de vista de interés social, independientemente de la trascendencia médica y científica de lograr una posible terapia útil para pacientes con grave discapacidad neurológica, supuestamente irreversible, hemos de señalar que uno de los principales objetivos del presente estudio se centra en poder conocer con rigor metodológico si las nuevas técnicas de terapia celular, y concretamente el empleo de células mesenquimales autólogas de médula ósea expandidas, permite ofrecer una mejora de la calidad de vida de pacientes con paraplejia crónicamente establecida. En el momento actual, la terapia celular se configura como una promesa terapéutica, sujeta aún a muchas incógnitas, y con una importante confusión en cuanto a sus posibles resultados, por la disparidad de protocolos, selección de sujetos, tipo de células a utilizar, dosis y vías de administración, sin contar con el afán de lucro de quienes aplican estas técnicas sin conocimientos adecuados y sin suficiente experiencia preclínica. La perspectiva de lograr medicamentos de terapia celular aplicables a la lesión medular representa obviamente un objetivo legítimo por las empresas farmacéuticas, pero que olvida con frecuencia las características peculiares del paciente parapléjico, y en el que creemos inaceptable cualquier tipo de terapia celular que requiera inmunosupresión, por las repetidas infecciones urinarias que suele padecer debidas a su propia patología. Por otra parte, la experiencia preclínica de nuestro grupo sugiere que, al menos en el ámbito del



Sistema Nervioso, no debe plantearse, salvo situaciones excepcionales, el empleo de células alogénicas y que dentro del tratamiento autólogo, es crucial prestar atención tanto a las características morfológicas de la lesión medular, al objeto de realizar tratamientos personalizados, como a numerosos detalles técnicos, entre los cuales se deben destacar los relacionados con el medio de suspensión celular, con el calibre de la aguja de inyección, ritmo de administración de las células en las zonas de lesión, o con lograr una alta concentración de células en el menor volumen posible, al objeto de no producir un daño añadido a la médula espinal lesionada. Estas consideraciones nos llevan a plantear la necesidad de que estas nuevas técnicas, al menos en su fase actual de investigación clínica, sean aplicadas únicamente en centros de referencia bajo un estricto control ético y de rigor metodológico y siempre por grupos de investigación con experiencia preclínica acreditada.

## **RESULTADOS DEL PRIMER ENSAYO CLÍNICO AUTORIZADO EN ESPAÑA PARA EL TRATAMIENTO DE PACIENTES CON PARAPLEJIA COMPLETA CRÓNICAMENTE ESTABLECIDA**

---

En el primer ensayo clínico autorizado en España para el tratamiento con terapia celular de pacientes con paraplejia completa, crónicamente establecida, se incluyeron 12 pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre los 18 y los 60 años, con secuelas funcionales crónicamente establecidas por lesión traumática de la médula espinal en segmentos medulares comprendidos entre los cuerpos vertebrales C6 y L1 y consideradas irreversibles (sin respuesta a ningún otro tratamiento) (Vaquero et al, 2016).

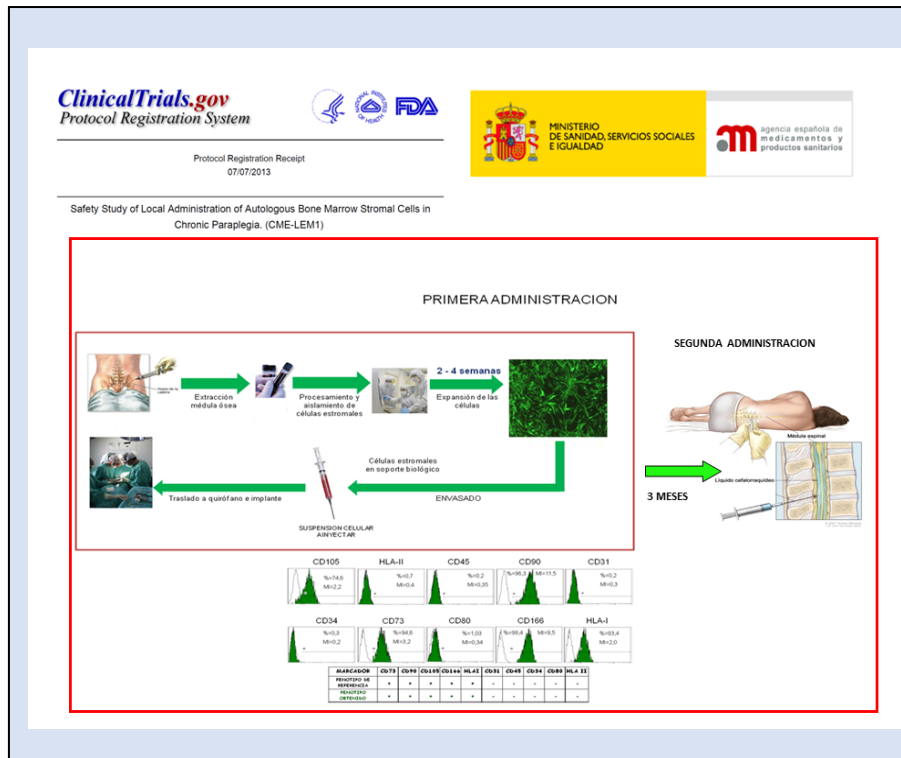


Figura 15.- Esquema general del Ensayo Clínico. Administración intratecal y en tejido medular adyacente, mediante abordaje quirúrgico, de una dosis variable de células de acuerdo al protocolo del estudio. La administración se hace por microinyección controlada y el número de células a administrar y el volumen de cada inyección se calcula a partir de las imágenes proporcionadas por Resonancia Magnética. A los 3 meses de la cirugía se administró en todos los casos, por punción lumbar 30 millones adicionales de células, en espacio subaracnoideo. Todos los pacientes han tenido un seguimiento de 1 año tras el momento de cirugía, con recogida de variables de eficacia previas al tratamiento (estudio basal) y en los meses 3, 6, 9 y 12. Los estudios de neurofisiología se realizaron previos al tratamiento (estudio basal) y a los 6 y 12 meses tras la cirugía. Los estudios de neuroimagen y de urodinámica se realizaron con anterioridad al inicio del tratamiento (estudio basal) y a los 12 meses tras la cirugía.

## PLANIFICACIÓN QUIRÚRGICA

Una de las principales características del ensayo fue la planificación del tratamiento de cada paciente de forma individualizada, teniendo en cuenta el margen de células a administrar (según el protocolo del Ensayo Clínico, entre 100 y 230 millones en el curso de la cirugía) y las características de la lesión observadas en el estudio de neuroimagen. En una reciente publicación llamamos la atención acerca de la escasa importancia que se da en la literatura a algo tan crucial como es el estudio morfológico de la lesión medular en los escasos estudios clínicos publicados hasta ahora (Vaquero y Zurita, 2013).

La planificación quirúrgica se hizo de acuerdo a los datos de RM y a las directrices de tratamiento aprobados en el protocolo del estudio. De acuerdo a las características de la lesión, en la primera administración de células (por medio de cirugía) se administró en los pacientes una dosis entre 100 y 230 millones de células

(media de  $165 \times 10^6$  de células intratecales, considerando como tal tanto la administración intramedular como en espacio subaracnoideo, y de las cuales 30 millones fueron siempre administradas en el espacio subaracnoideo perilesional). De acuerdo al protocolo del estudio todos los pacientes recibieron, además, otros 30 millones de células, a los 3 meses de la intervención quirúrgica, por punción lumbar. Como consecuencia, la dosis total de células administradas ha oscilado entre 130 y 260 millones (media  $\pm$  SD de  $202.5 \pm 46.73$  millones).

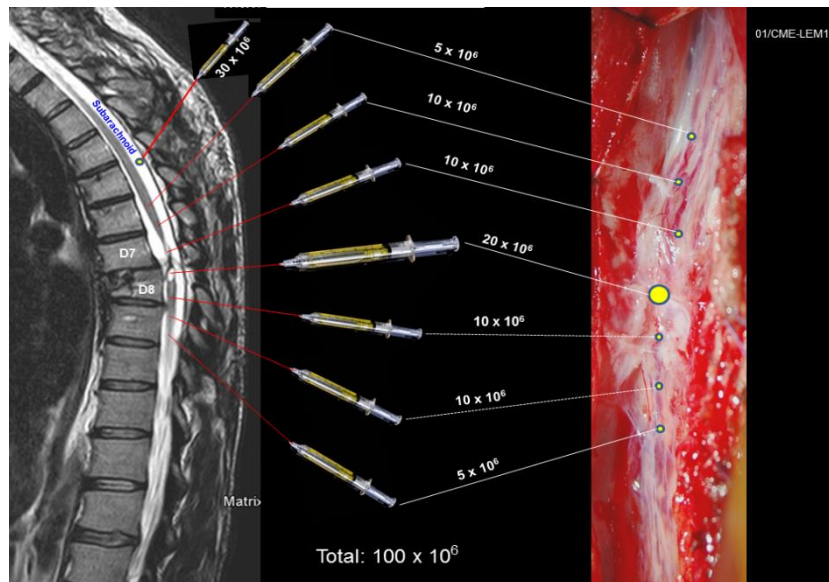


Figura 16.- Varón de 37 años. Lesión D7-D8. Más de 4 años de cronicidad. Administración, en cirugía, de un total de 100 millones de MSC.

### Valoración Funcional Escala ASIA

La escala ASIA (American Spinal Injury Association) permite valorar la sensibilidad superficial (LTS), la sensibilidad al dolor (PPS), y el grado de movimiento en músculos clave de las extremidades (MS). La suma de LTS, PPS y MS configuran la valoración del ASIA TOTAL.

La **recuperación de sensibilidad** en nuestros pacientes fue un hallazgo sorprendente y constante tras la terapia celular. Ha sido variable, de unos pacientes a otros y se puede apreciar incluso en la primera semana tras la cirugía. El análisis a lo largo del seguimiento evolutivo de los pacientes mostró que la recuperación de sensibilidad es progresiva en el tiempo, tanto en lo que se refiere a la sensibilidad superficial (LTS) como a la sensibilidad al dolor (PPS). En las gráficas adjuntas se muestra la progresión en cuanto a recuperación de sensibilidad de los pacientes de nuestra serie, a los 3, 6, 9 y 12 meses de seguimiento tras la cirugía.

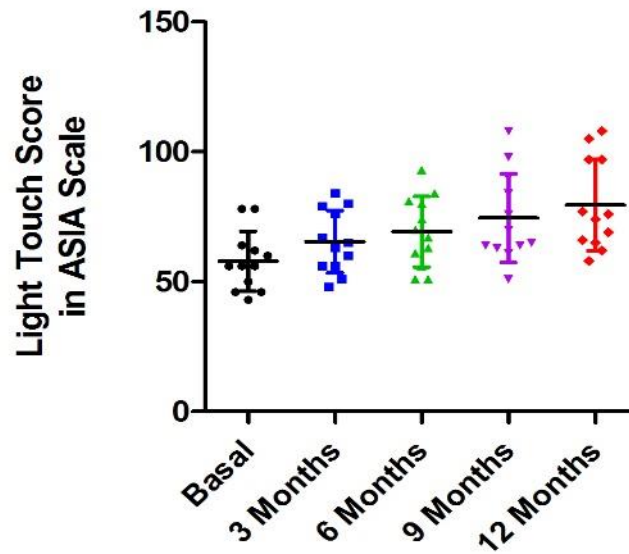


Figura 17.- Recuperación progresiva de sensibilidad superficial (LTS) observada a los 3, 6, 9 y 12 meses de la cirugía, con diferencias estadísticamente significativas respecto de la sensibilidad basal, con  $p$  de 0.0059, 0.0038, 0.0025 y 0.0025, respectivamente.

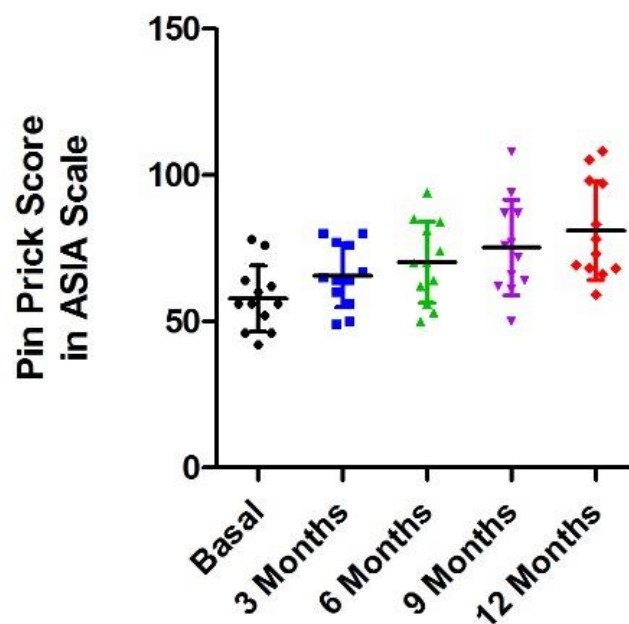


Figura 18.- Cambios progresivos en cuanto a recuperación de sensibilidad (PPS) a los 3, 6, 9 y 12 meses con diferencias estadísticamente significativas respecto del valor basal, con  $p$  de 0.0059, 0.0010, 0.0005 y 0.0005, respectivamente.

La interpretación de estos hallazgos es difícil, por cuanto que no parece razonable pensar que se produce, de forma precoz (semanas), una regeneración de vías sensitivas, siendo más lógico considerar que las células administradas actúan liberando sustancias tróficas o activadoras de unas vías nerviosas previamente existentes, pero no funcionantes.

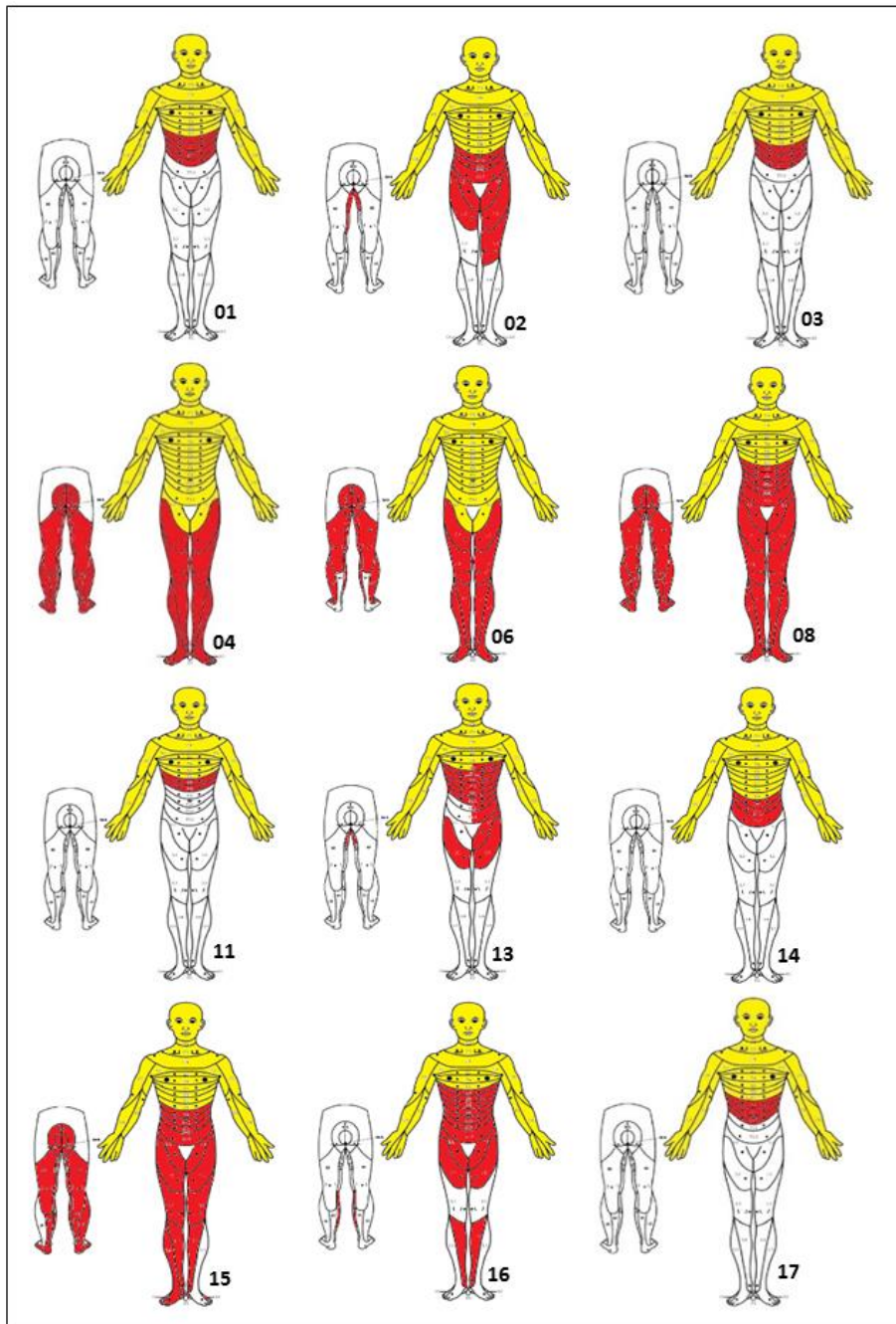


Figura 19. Recuperación de sensibilidad a los 12 meses, en los pacientes de la serie. En rojo, dermatomos donde existe algún grado de sensibilidad. En amarillo, sensibilidad basal. En blanco, total anestesia. De acuerdo con este esquema, en nuestros pacientes se constata, al año del tratamiento, una recuperación de sensibilidad que oscila entre 2 y 14 niveles (dermatomos) con una media de  $6.8 \pm 4.0$ .

En cuanto a la **recuperación motora** valorada en la escala ASIA (Motor Score o MS) nuestra serie partía de una situación de total ausencia de movimiento de miembros inferiores (MS 50) en todos los casos, excepto en el paciente 06, con un nivel de lesión D11-D12, donde en el estudio basal se recogió clínicamente un MS de 52, por mantener, a pesar de ser ASIA A, alguna actividad motora en músculos flexores de

cajera. La gráfica adjunta muestra, a lo largo del estudio, la recuperación de MS en nuestros pacientes:

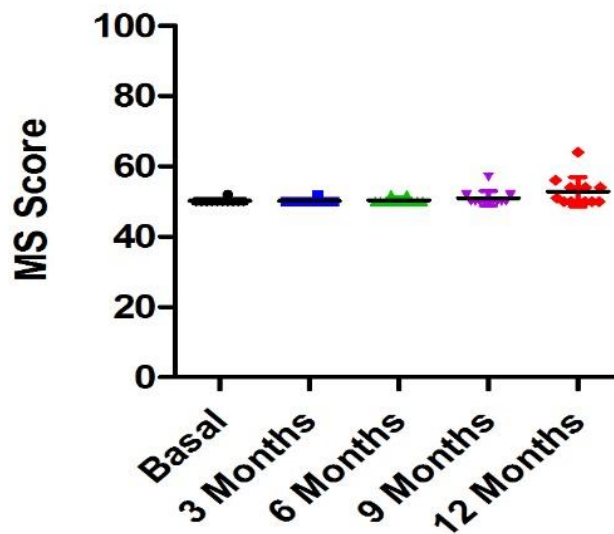


Figura 20.- Evolución del MS en nuestra serie, a los 3, 6, 9 y 12 meses tras la cirugía, sin diferencias estadísticamente significativas respecto del valor basal a los 3, 6 y 9 meses ( $p: 0.1736$  a los 9 meses de evolución). Sin embargo, a los 12 meses se detecta diferencia significativa respecto de la situación basal ( $p: 0.0340$ ).

La recuperación de MS de acuerdo a la valoración ASIA, aunque discreta, se considera un hallazgo extremadamente importante de eficacia, teniendo en cuenta su significado clínico en el contexto de los pacientes de la serie. La paciente 06 (nivel de lesión D11-D12), que presentaba en el estudio basal un MS de 52, pasó a un MS de 57 a partir de los 9 meses, finalizando el estudio, a los 12 meses de seguimiento, con un valor de MS de 64 y pasando de ser un ASIA A, a un ASIA C. El paciente 04 (nivel de lesión D11-D12) mostró un MS de 56 en la valoración de 12 meses y finalizó el estudio como ASIA B. La paciente 08 (nivel D6-D7) pasó a tener un MS de 52 a los 9 meses y de 54 a los 12 meses, finalizando también el periodo de seguimiento como ASIA B. El paciente 13 (nivel D3) recuperó 1 punto de MS en la valoración final de los 12 meses y los pacientes 14 y 15 recuperaron 4 puntos de MS, el primero de ellos (nivel D7-D8) al final del periodo de seguimiento y el segundo (nivel D6-D7) a partir del mes 6, momento en que mostró 2 puntos de recuperación, manteniéndose esta puntuación motora a los 9 meses, y alcanzando los 4 puntos de recuperación motora en el estudio de 12 meses. Esta paciente finalizó también el estudio como ASIA B, alcanzando este grado de valoración a partir de la visita de los 6 meses.

En la siguiente imagen se muestra uno de nuestros pacientes con paraplejía completa de 7 años de evolución y nivel D4-D5, que es capaz de “andar” en piscina a los 18 meses de la cirugía.



Figura 21.- Paciente "andando" en piscina. Lesión completa D4-D5. 18 meses de evolución tras el trasplante quirúrgico intramedular de células mesenquimales autólogas.

Teniendo en cuenta las características de la escala ASIA, parece lógico que los cambios de MS tengan una cierta correlación con el nivel de lesión neurológica, de modo que en pacientes con nivel bajo de lesión sea más fácil obtener mayor puntuación de MS en miembros inferiores. Cuando hemos tratado de correlacionar mejoría de MS tras 1 año de seguimiento con nivel de lesión, se aprecia, efectivamente que la recuperación de MS se asocia a un nivel más bajo de lesión medular (con  $p$ : 0.0293 en estudio de correlación de Pearson, con  $r$  de 0.6264 y 95% C.I. entre 0.08176 y 0.8829), aunque no se confirma significación estadística en el test de Spearman, donde obtuvimos un valor de  $p$  de 0.1474, con  $r$  de 0.4443 y 95 % CI entre -0.1928 y 0.8179).

Por otra parte, una observación importante es que, al contrario de lo que podría suponer, no hemos encontrado ninguna correlación en nuestra serie, entre recuperación motora (MS) en la escala ASIA y cronicidad de la lesión o edad de los pacientes. De hecho, los mejores resultados de recuperación funcional motora se han obtenido en la paciente 08, con 58 años de edad, que presentaba una importante lesión medular a nivel D6-D7 y más de 17 años de cronicidad. Tampoco hemos encontrado correlación significativa entre número de células administradas y recuperación motora a lo largo del estudio ( $p$ : 0.6923 en el test de correlación de Spearman).

A pesar de sus posibles limitaciones, la **valoración de ASIA TOTAL** se puede considerar como una variable útil para conocer si la terapia celular representa un

tratamiento efectivo en pacientes con lesión medular. Representa la suma de puntuaciones de sensibilidad (PPS y LTS) y de actividad motora (MS). De acuerdo a esta variable, hemos podido constatar en nuestros pacientes una clara y progresiva mejoría de su estado funcional a lo largo del periodo de seguimiento, sin que al cabo del año desde la cirugía se haya llegado a una estabilización de la mejoría, tal como se muestra en las gráficas siguientes.

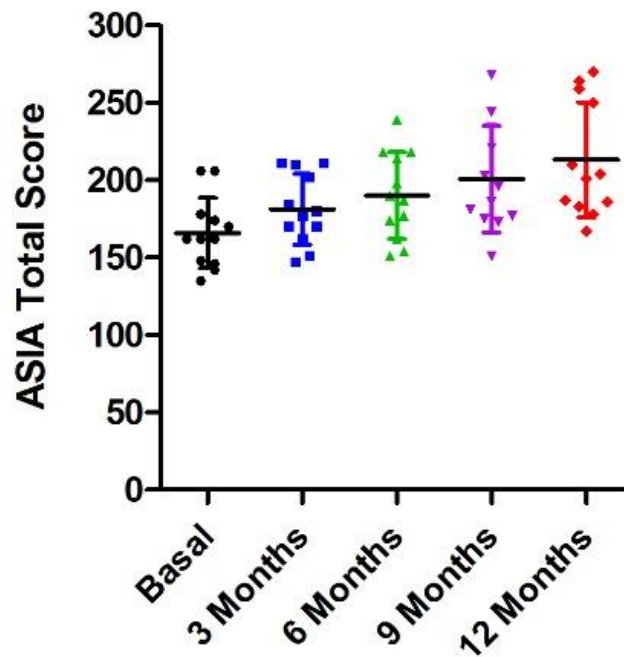


Figura 22.- Progresiva mejoría de ASIA TOTAL con diferencias estadísticamente significativas respecto de los valores basales, a lo largo del estudio. A los 3, 6, 9 y 12 meses, se obtuvo un valor de p de 0.0059, 0.0010, 0.0005 y 0.0025, respectivamente.

### Escalas de Independencia Funcional (MIF y Barthel)

Las escalas de MIF y Barthel se utilizan generalmente como una medida de independencia funcional. En nuestro estudio no hemos encontrado, a lo largo del tiempo de seguimiento, diferencias significativas entre la puntuación basal de dichas escalas y las puntuaciones recogidas en las visitas de seguimiento, a los 3, 6, 9 y 12 meses de seguimiento. Nuestra interpretación de este hecho es que estas escalas tienen escaso valor para la evaluación de nuestros pacientes, generalmente muy adaptados a su discapacidad tras muchos años de lesión, ya que valoran la adaptación del paciente a su discapacidad más que la discapacidad en sí misma. Como ejemplo, la discapacidad de un paciente que requiere mantener una sonda urinaria no puntúa como tal discapacidad si el paciente puede manejar su sonda por sí mismo.



## Escala analógica EVA

La escala de EVA (VAS, “visual analogue scale”) es una escala analógica que permite medir la intensidad del dolor de forma subjetiva por el paciente en un rango de 0 a 10. A pesar de sus obvias limitaciones se utiliza generalmente para valorar la intensidad del dolor neuropático. Una de las principales preocupaciones en el diseño de nuestro estudio fue el riesgo de que la intervención quirúrgica o la administración celular pudiera de algún modo aumentar el dolor neuropático de los pacientes con una paraplejía crónicamente establecida, sobre todo teniendo en cuenta que un aumento transitorio de neuropathic pain ha sido descrita en algunas publicaciones previas.

Aunque en nuestra serie solo 7 de los 12 pacientes (58 %) presentaban dolor neuropático significativo, hemos prestado especial cuidado a valorar esta posibilidad, ya que podría representar una limitación del tratamiento, sin que en ningún caso hayamos podido observar un empeoramiento, aunque fuera transitorio, del dolor neuropático, o aparición de dolor neuropático en pacientes que no tenían previamente.

En la siguiente gráfica se señala la valoración del dolor neuropático por los pacientes, a lo largo del estudio. Su análisis muestra que, por el contrario, existe una tendencia a la disminución del dolor neuropático tras el tratamiento, sin que se llegue a alcanzar significación estadística. Esta tendencia a la disminución del dolor neuropático se confirma por el análisis del dolor en la escala IANR-SCIFRS, donde sí se alcanza significación estadística de eficacia ( $p: 0.0477$ ) al final del periodo de seguimiento de los pacientes.

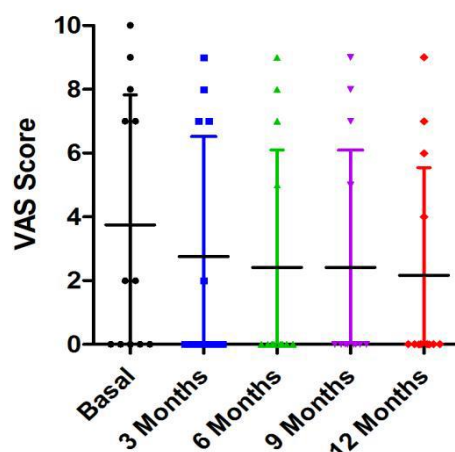


Figura 23.- Evolución de los valores de la escala EVA (VAS) a lo largo del estudio. Se observa una tendencia a la disminución del dolor neuropático, pero sin alcanzar significación estadística a lo largo del seguimiento de los pacientes ( $p: 0.5000$  a los 3 meses,  $p: 0.8090$  a los 6 y 9 meses, y  $p: 0.0545$ , a los

12 meses). Estos datos no se modifican analizando la evolución únicamente de los 7 pacientes que presentaban dolor neuropático al inicio del estudio.

### Escalas de Penn y modificada de Ashworth

La escala de Penn (que mide número e intensidad de espasmos) y la escala modificada de Ashworth (que valora espasticidad) representan otra valoración útil de posible eficacia del tratamiento y que también han permitido demostrar mejoría, estadísticamente significativa, a lo largo del estudio.

Los espasmos musculares y la espasticidad están presentes en la inmensa mayoría de los pacientes con una paraplejia crónicamente establecida y limitan de forma extraordinaria su calidad de vida. Tras la intervención quirúrgica efectuada para la primera administración de terapia celular, todos los pacientes de nuestra serie manifestaron, ya en el postoperatorio inmediato, una disminución en el número e intensidad de los espasmos, en algún caso con desaparición completa, siendo habitual que en las semanas siguientes volvieran a aparecer, pero siempre con menor frecuencia e intensidad.

La posibilidad de que la disminución de espasmos y rigidez fueran debidos a la manipulación quirúrgica de la médula espinal fue descartada al comprobar la evolución de puntuaciones en estas escalas a lo largo del tiempo de seguimiento de los pacientes.

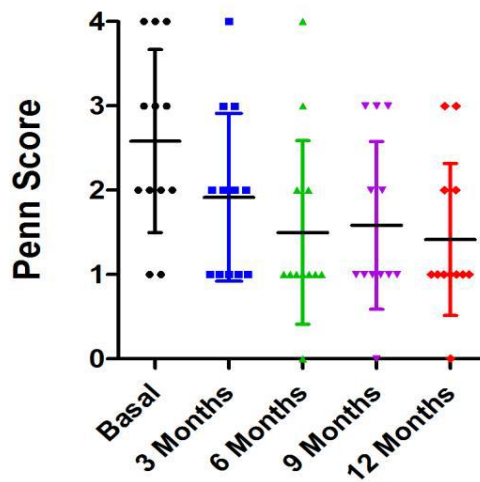


Figura 24.- Evolución de las puntuaciones en la escala de Penn, a lo largo del estudio. En comparación con la situación basal, se observó diferencia estadísticamente significativa a los 3 meses ( $p: 0.0305$ ), 6 meses ( $p: 0.0115$ ), 9 meses ( $p: 0.0120$ ) y 12 meses de seguimiento ( $p: 0.0126$ ).

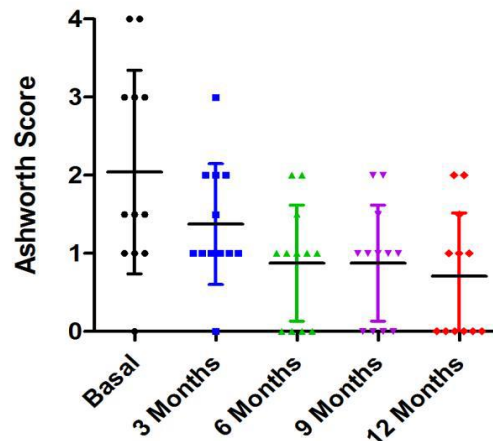


Figura 25.- Puntuaciones en la escala de Ashworth a lo largo del estudio. Se aprecia una disminución progresiva de la espasticidad, con clara significación estadística a los 3 meses ( $p: 0.0211$ ), 6 meses ( $p: 0.0036$ ), 9 meses ( $p: 0.0036$ ) y 12 meses de seguimiento ( $p: 0.0037$ ).

En definitiva, existe una evidente acción de la terapia celular mejorando la espasticidad de los pacientes y el número e intensidad de los espasmos, sin que hayamos podido establecer correlación entre grado de mejoría y número de células administradas (tests de Pearson y Spearman). Este efecto beneficioso se ve reflejado también de forma constante en los informes periódicos que hemos recibido por parte de los propios pacientes y de los fisioterapeutas encargados de su rehabilitación. Tan solo en uno de los pacientes (paciente 03) los espasmos volvieron a aparecer con mayor frecuencia tras haber desaparecido en los primeros tres meses siguientes a la cirugía, pero en cualquier caso, con menor intensidad que antes del tratamiento, manteniendo esta misma situación al final del estudio. En la tabla adjunta se muestra el resumen del análisis estadístico realizado en lo que se refiere a las escalas de Penn y Ashworth.

### Escala NBD (“Neurogenic Bowel Dysfunction”)

En el paciente con lesión medular y paraplejia crónicamente establecida, la ausencia del control de esfínteres representa una de las principales causas de discapacidad por su trascendencia personal y social. Aunque por lo general se considera que la necesidad de llevar una sonda urinaria permanente o la necesidad sondajes intermitentes es el principal problema, la realidad es que son mucho más discapacitantes las manifestaciones del intestino neurógeno que presentan los pacientes, de forma prácticamente constante.

La valoración a lo largo del estudio de las manifestaciones de intestino neurógeno, se ha hecho mediante la escala NBD (Neurogenic Bowel Dysfunction) (Krogh et al,

2006). Esta escala consta de 10 apartados en los que se dan diferentes puntuaciones a aspectos como la frecuencia con la que se hace deposición, tiempo que se necesita para cada defecación, malestar durante la defecación, necesidad de medidas para facilitar ésta, incontinencia fecal o de gases, etc.

Fue un hecho sorprendente y prácticamente constante la información de los pacientes acerca de que tras la cirugía estaban normalizando la evacuación intestinal, de forma que notaban movimiento peristáltico y la defecación se modificaba claramente en cuanto a su frecuencia y al tiempo que necesitaban, pasando incluso de defecar cada semana y necesitando más de una hora, a defecar diariamente y en pocos minutos, sin necesidad de supositorios ni laxantes. La mejoría es inmediata y muy marcada en los 3 primeros meses tras la cirugía, es progresiva en el tiempo y se describe como algo extraordinariamente gratificante en la práctica totalidad de los informes periódicos de nuestros pacientes, así como en sus manifestaciones grabadas en video.

En la siguiente gráfica se muestran las puntuaciones recogidas, a lo largo del estudio de nuestra serie, en la escala NBD.

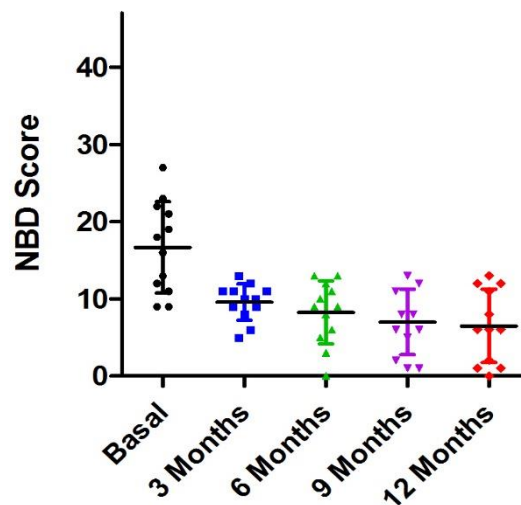


Figura 26.- En el análisis realizado a lo largo del estudio se aprecia una disminución progresiva en la discapacidad relacionada con el intestino neurógeno, según la escala NBD. A los 3 meses de la cirugía existe ya una diferencia, con clara significación estadística ( $p: 0.0059$ ) respecto de las puntuaciones basales. Se mantiene la misma significación estadística en el análisis efectuado a los 6, 9 y 12 meses tras la cirugía, con una clara tendencia a la mejoría progresiva en los síntomas de intestino neurógeno.

La observación de que la mejoría que describían los pacientes en los 3 primeros meses parecía ser mayor en aquellos que habían recibido un mayor número de células en la cirugía, dentro de la variabilidad permitida por nuestro protocolo de estudio, nos llevó a hacer un análisis de correlación entre puntos de mejoría en la

escala NBD, en la visita de seguimiento de 3 meses, y número de células administradas, encontrando una clara correlación en el test de correlación de Spearman (p: 0.00347).

Igualmente, se ha hecho un análisis de correlación al final del estudio entre puntos de mejoría en la escala NBD y número total de células administradas (suma de células en la cirugía y células administradas a los 3 meses por vía subaracnoidea) encontrando también una clara significación estadística (p:0.0219). En este momento del seguimiento (12 meses tras la cirugía) uno de nuestros pacientes (paciente 17, con más de 22 años de paraplejia y una disfunción intestinal neurógena incapacitante) ha pasado de un valor basal de 18 (severa disfunción) a una puntuación 0 (ausencia de intestino neurógeno).

Siendo la mejoría en las manifestaciones de intestino neurógeno uno de los aspectos más llamativos y gratificantes para los pacientes, resulta chocante la falta de atención a este hecho en las escasas publicaciones previas de la literatura, lo que interpretamos por las características de nuestro medicamento de terapia celular y fundamentalmente por el elevado número de células que hemos administrado en nuestro estudio, muy superior al utilizado en los escasos ensayos clínicos publicados.

## ESTUDIOS URODINÁMICOS

---

Siendo la vejiga neurógena uno de los mayores problemas asociados a la lesión medular y que determina la necesidad de llevar una sonda vesical permanente o realizar autosondajes periódicos, con sus importantes implicaciones personales y sociales, hemos prestado especial atención en nuestro estudio a un análisis objetivo, mediante pruebas urodinámicas, de una posible mejoría en los parámetros de disfunción urológica.

El estudio urodinámico se ha realizado siempre por un único especialista, con amplia experiencia en el manejo de la vejiga neurógena, y utilizando un equipo Solar Luna de Medical Measurement Systems (MMS) Inc. Dover, NH, USA. En todos los casos se hizo un estudio basal, antes de iniciar el tratamiento, y un estudio final, a los 12 meses de la cirugía. Todos los estudios urodinámicos se realizaron en ausencia de infección urinaria. Como datos de eficacia se recogieron los aportados por la flujometría libre, en los casos en que había micción, y los datos de llenado vesical, utilizando un catéter uretral de doble vía MMS de 10 F, para determinar la presión vesical y el llenado vesical, con una velocidad de infusión de agua destilada de 50 ml/minuto. Una sonda rectal de 12 F se utilizó para recoger la presión

intraabdominal. Se recogió la primera sensación al llenado (ml), capacidad vesical máxima (máxima capacidad cistométrica) (ml), presión del músculo detrusor (cm/H<sub>2</sub>O) y la acomodación vesical (“compliance”). Por último, se realizó un test de presión/flujo en casos en que era posible la micción.

En la exploración basal no se pudo obtener flujometría libre ni se pudo realizar test de presión flujo en ningún paciente, por ausencia de micción. Sin embargo, en la exploración de los 12 meses se obtuvo micción voluntaria en 3 pacientes y se pudo realizar test de presión/flujo en 4 pacientes. Analizando todos los pacientes y de acuerdo a los datos urodinámicos, 10 de ellos (83.3%) mostraron mejoría a los 12 meses tras la cirugía, en comparación con los datos recogidos antes de la terapia celular.

En el estudio de llenado vesical se observó, a los 12 meses tras la cirugía, un aumento de capacidad vesical máxima (máxima capacidad cistométrica) en 8 pacientes, y una disminución de la presión del músculo detrusor en 9 pacientes. En la totalidad de la serie, 10 de los 12 pacientes mejoraron claramente en la acomodación vesical (“compliance”), con clara significación estadística respecto de los valores de acomodación vesical recogidos en el estudio urodinámico basal (p: 0.0020). En 2 pacientes (pacientes 03 y 08) no se observaron cambios en la acomodación vesical. En cualquier caso, la mejoría de la acomodación vesical no mostró correlación con el número de células administradas a los pacientes o con las mejorías obtenidas en la escala ASIA

## ESTUDIOS NEUROFISIOLÓGICOS

---

En los estudios de Neurofisiología, todos los pacientes (100%) han mostrado datos de mejoría a lo largo del periodo de seguimiento tras la terapia celular. Se han analizado, como variables de eficacia, la posible recuperación de potenciales evocados somatosensoriales (PESS), la posible recuperación de potenciales evocados motores (PEM) por estimulación magnética transcraneal, la detección de potenciales claramente identificables como de contracción voluntaria, mediante electromiograma (EMG) de aguja en músculos infralesionales, y la posible detección de músculos infralesionales que mostrasen potenciales de reinervación muscular activa.

En el análisis final de resultados, se prestó especial atención a descartar como potenciales evocados algunos registros que fueron informados inicialmente como potenciales dudosos, ya sea por sus características o reproducibilidad. De este modo, solo se han considerado como potenciales aquellos que en la valoración final

de los datos se han considerado como evidentes por dos neurofisiólogos independientes. En cuanto al registro EMG, el protocolo de estudio contempló analizar un número limitado de músculos en las extremidades inferiores (fundamentalmente tibial anterior y cuádriceps) pero al observar, a lo largo del seguimiento de los pacientes, que clínicamente se recogía actividad motora en musculatura de pared abdominal o en músculos infralesionales no contemplados en la exploración basal, se amplió el número de músculos a estudiar, estudiando por lo general aquellos músculos en que hubiera sospecha de recuperación funcional, de acuerdo a la información recogida en los controles clínicos de los pacientes. En cualquier caso, los datos recogidos de recuperación muscular estimamos que están infravalorados, puesto que determinados músculos no pudieron ser objeto de exploración EMG, por motivos técnicos, a pesar de que clínicamente se recogían signos de recuperación funcional.

El estudio neurofisiológico realizado **a los 6 meses tras la cirugía** permitió recoger la reaparición de PESS en 5 pacientes de la serie (pacientes 02, 06, 08, 13 y 14) y de PEM en 2 pacientes (02 y 06). En 3 pacientes (08, 15 y 16) se objetivó que existían inequívocos potenciales de contracción voluntaria en músculos por debajo de la lesión. En la paciente 08, con nivel de lesión D6-D7, se recogió actividad motora voluntaria en segmentos inferiores del músculo recto abdominal, con inervación correspondiente a raíces nerviosas D12 (5 segmentos medulares por debajo del nivel de lesión) existiendo además potenciales polifásicos característicos de un proceso activo de reinervación muscular, tanto en este músculo como en el tibial anterior. En la paciente 15, también con lesión D7-D8 se recogieron potenciales de contracción voluntaria en miotomos paraumbilicales del músculo recto abdominal (D10) obviamente por debajo de la zona de lesión y en el paciente 16, con lesión a nivel D4-D5 se observó por EMG contracción voluntaria en ambos gemelos (nivel S2), lo que supone considerar una regeneración de vías motoras a distancia muy considerable del nivel lesional. Además, tras contracción muscular pasiva se recogieron potenciales polifásicos, característicos de reinervación activa, en músculo infralesionales en 6 casos (pacientes 03, 06, 08, 11, 13 y 14).

En el estudio neurofisiológico realizado **a los 12 meses tras la cirugía**, se recogió la existencia de PESS en 7 pacientes (01, 02, 04, 06, 08, 13 y 16). En los pacientes 01, 04 y 16, revisando los registros previos, se consideró que no existían previamente, por lo que eran de nueva aparición en el estudio de 12 meses tras la cirugía, lo que apoya la mejoría progresiva en el tiempo de los parámetros neurofisiológicos, junto con el hecho de que se detectaron mejorías en los parámetros de amplitud y latencia en los PESS ya presentes en el estudio de 6 meses. Al final del periodo de seguimiento de los pacientes se ha detectado en la presencia de PEM en 3 pacientes (02, 06 y 08, los dos primeros con PEM presentes ya a los 6 meses y mostrando

signos de mejor definición en este momento evolutivo). Signos EMG de contracción voluntaria en músculos por debajo del nivel de lesión se detectaron en 6 pacientes (04, 06, 08, 14, 15 y 16). Tres de ellos (08, 14 y 15) mostraban ya contracción voluntaria a los 6 meses. Potenciales polifásicos característicos de la existencia de reinervación activa infralesional se detectó, en músculos infralesionales en 9 pacientes (02, 03, 04, 06, 08, 11, 13, 15 y 16).

En definitiva, los registros neurofisiológicos han demostrado de forma objetiva que el tratamiento realizado permite la regeneración de vías nerviosas, lo que se traduce por una reaparición de potenciales evocados previamente inexistentes y por una clara reinervación muscular infralesional, a distancias previamente impensables, considerando el nivel de la lesión neurológica y sus características de lesión medular completa y crónica.

El siguiente esquema muestra un ejemplo correspondiente a nuestro paciente 08. Se trata de una paciente de 58 años de edad en el momento de ser sometida al tratamiento, con casi 18 años de paraplejia completa (ASIA A) por lesión a nivel D6-D7. Tras la cirugía ha experimentado de forma progresiva una recuperación espectacular de sensibilidad, llegando ahora a tener sensibilidad en todo el cuerpo y pasando, a los 3 meses, de un grado ASIA A, a un grado de ASIA B. En el estudio de 6 meses se recogió la reaparición de PESS y a los 12 meses también de PEM. A los 6 meses se apreció contracción voluntaria en rectos abdominales y signos de reinervación activa en tibial anterior. A los 12 meses el EMG detecta potenciales de contracción muscular voluntaria, junto con signos de reinervación muscular, en recto abdominal, iliopsoas, cuádriceps, gemelos y tibial anterior.



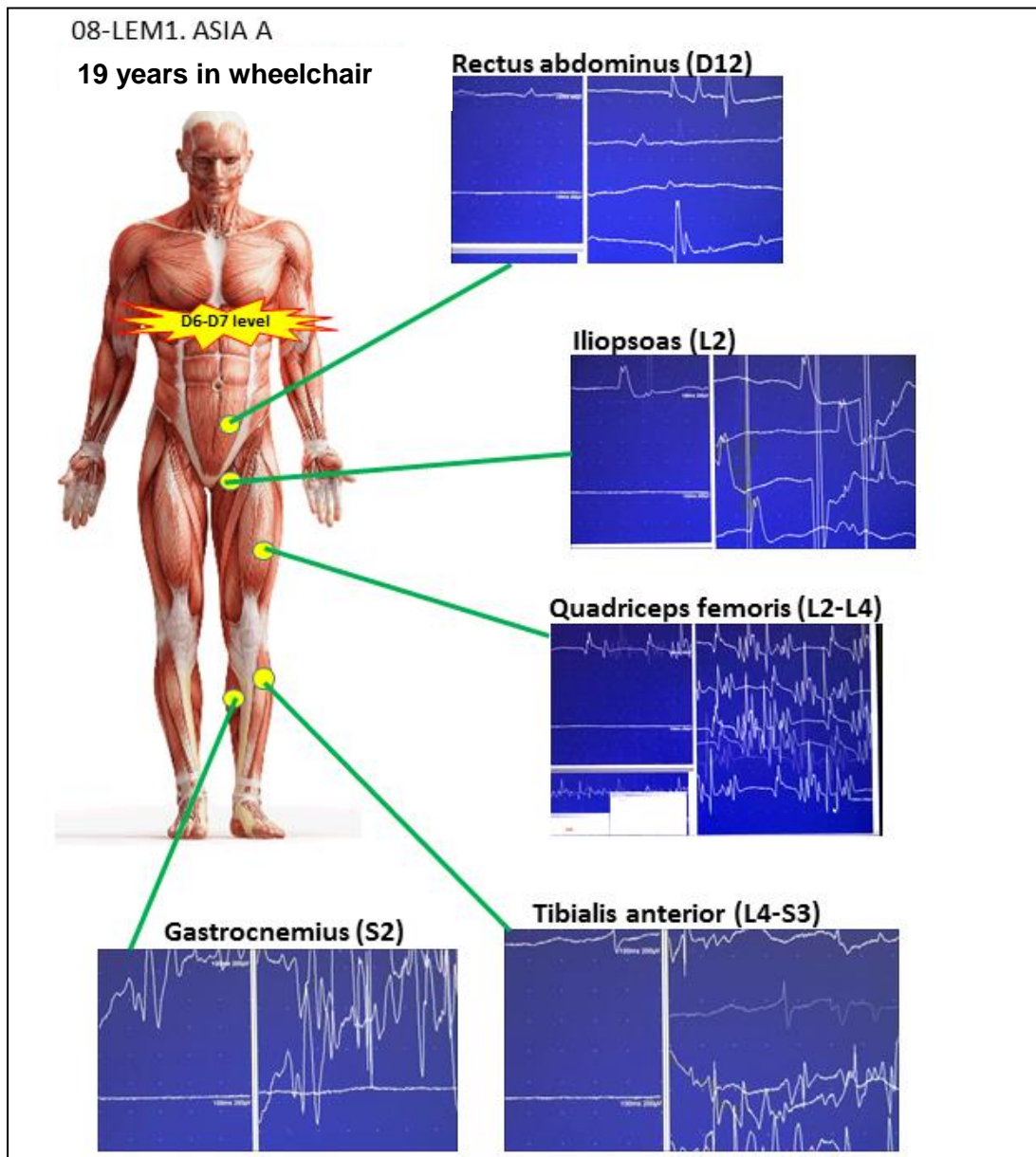


Figura 27.- Paciente 08.- Registro EMG de contracción muscular voluntaria en músculos infralesionales, a los 12 meses del tratamiento. Nivel de lesión D6-D7. ASIA A previamente al tratamiento, siendo ASIA B desde el tercer mes tras la cirugía.

## ESTUDIOS DE NEUROIMAGEN

Las modificaciones de la Resonancia Magnética (RM) son difíciles de interpretar debido a que muchos de los pacientes tienen sistemas de fijación vertebral que originan artefactos. Aunque estos artefactos no son impedimento para valorar, previamente a la cirugía, la zona y extensión de la lesión medular y hacer una planificación del número de células y volumen a inyectar, condicionan que no sea fiable el análisis del volumen de la lesión a efectos comparativos con exploraciones

diferidas en el tiempo. Por otra parte, los cortes sagitales de RM no son exactamente superponibles entre unas y otras exploraciones, lo que condiciona que sea poco fiable un análisis comparativo de detalles como volumen de quistes intramedulares o diámetro de la médula antes y después del tratamiento. Además, la experiencia adquirida a lo largo de nuestro estudio nos lleva a admitir que no es fácil la interpretación de imágenes, ya que muchas veces se observan zonas intramedulares supuestamente quísticas que en la cirugía corresponden a zonas malácicas, con tejido laxo o gliótico, sin auténticos quistes intramedulares. Como consecuencia de estas apreciaciones, hemos optado por hacer un análisis cualitativo de las modificaciones encontradas en nuestros pacientes al comparar los estudios basales y los realizados a los 12 meses tras la terapia celular. A pesar de ello, el volumen aproximado de las lesiones intramedulares, según medidas tomadas a partir de las imágenes de “efecto mielográfico” de la Resonancia, osciló entre 0.1 cc y 6.1 cc., con una media  $\pm$  desviación estándar de 2.2 cc.  $\pm$  2.05 cc. Las medidas fueron tomadas utilizando el software asociado al equipo de RM de 1.5 T (*“Siemens Imaging software, Siemens AG Medical Solutions, Erlangen, Germany”*) y el efecto mielográfico fue logrado con secuencias de “spin-echo”.

En ningún caso hemos encontrado imágenes sugerentes de empeoramiento del aspecto de la médula o de un aumento del volumen de la lesión, dentro de las limitaciones anteriormente descritas, existiendo sobre todo cambios de señal del tejido medular, cuya interpretación puede estar sujeta a discusión. En 2 casos de nuestra serie no se han detectado cambios importantes en lo que respecta a las características de la zona de lesión medular (pacientes 02 y 13) o bien se han detectado cambios menores que pueden estar relacionados con los distintos planos de corte al adquirir las imágenes.

Al menos en 7 pacientes (pacientes 01, 03, 04, 06, 08, 15 y 16) se han apreciado, a los 12 meses de la cirugía, una clara disminución de hiperintensidad, en fase T2, de lesiones intramedulares supuestamente quísticas, incluso con desaparición de las lesiones, que en la intervención quirúrgica se identificaron como una mezcla de zonas microquísticas y malácicas. De acuerdo con la experiencia preclínica de nuestro grupo, utilizando nuestro modelo de cerdo adulto parapléjico, estos cambios se deben relacionar con una progresiva “solidificación” de estas lesiones como consecuencia del trasplante celular, que genera un tejido nervioso nuevo con gran cantidad de brotes axonales (Zurita et al, 2009).

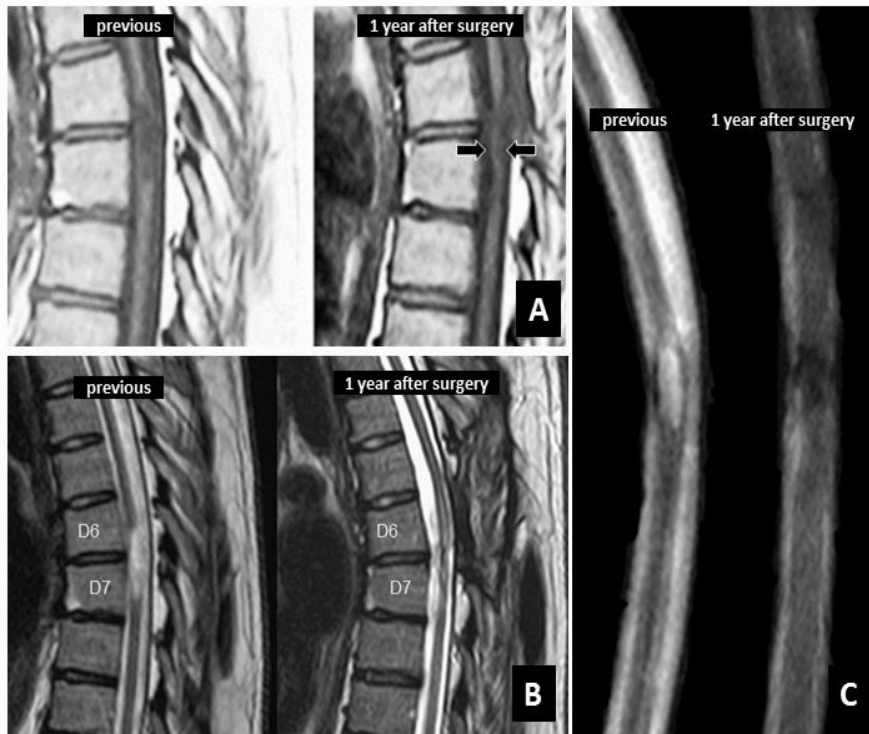


Figura 28.- Paciente 15.- En A se muestra la imagen de RM, en fase T1, basal y al año de la cirugía. Se observa (flechas) una reconstrucción del cordón medular, donde preoperatoriamente no se identificaba médula. En B se aprecia la lesión medular en fase T2. Al año ha desaparecido la lesión supuestamente quística y que en la cirugía se identificó como un tejido de aspecto malácico con microquistes. En C (RM con efecto mielográfico) se observa la evolución morfológica de la lesión medular. A los 12 meses tras la administración intralesional de las células ha desaparecido la lesión previa, hiperintensa. La zona de hipointensidad se interpreta como debida a depósitos de hemosiderina. Esta paciente recibió en la cirugía un total de 230 millones de células (150 millones de células en la zona de la lesión, 25 millones en médula sana, en cada uno de los extremos, por encima y por debajo de la lesión y 30 millones en espacio subaracnoideo adyacente).

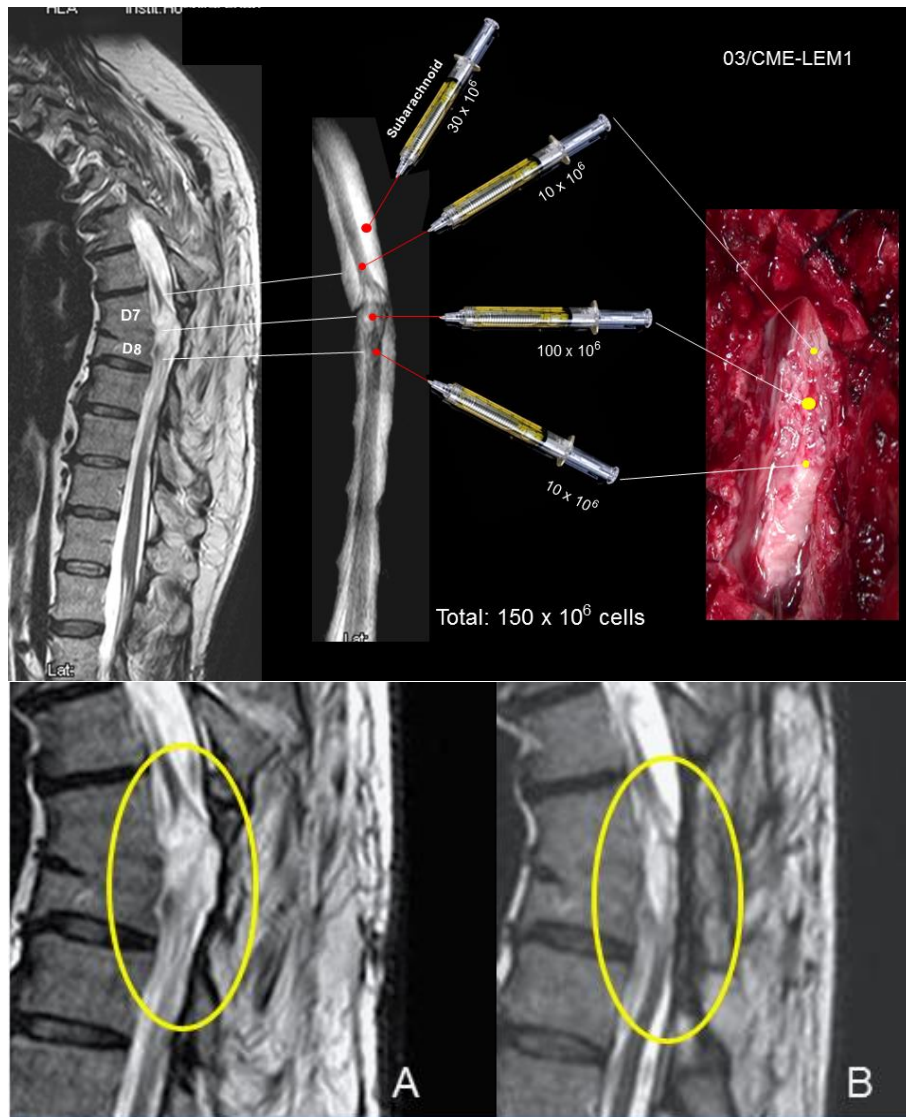


Figura 29.- Paciente 03.- En A, RM previa a la terapia celular, fase T2. Se aprecia una lesión extensa, supuestamente quística, que en la cirugía resultó ser una zona mielomalácica y cicatricial (ver la imagen de planificación quirúrgica). Se inyectaron 100 millones de células en la zona central de la lesión y 10 millones en los bordes, sobre médula de aspecto normal. En B, a los 12 meses de la cirugía, clara reducción de la lesión, con presencia de un fino cordón medular (flechas) que conecta los extremos de aspecto normal de la médula y que no era claramente identificable en la RM preoperatoria.

## CONCLUSIONES DEL ENSAYO CLÍNICO

El presente Ensayo Clínico reproduce fielmente en pacientes la experiencia previa con el tratamiento de terapia celular en modelos animales de paraplejía completa y crónica. A lo largo de los últimos 15 años, el trabajo sistemático en el laboratorio y en el quirófano experimental nos ha permitido sentar las bases para poder llevar a cabo el primer Ensayo Clínico autorizado en España para el tratamiento de la paraplejía crónicamente establecida. En este tiempo hemos conocido un número

creciente de publicaciones que sugieren la utilidad de la terapia celular en la lesión medular y al mismo tiempo hemos asistido a la descripción de protocolos clínicos y técnicas que, aun mostrando indicios de eficacia terapéutica en pacientes, adolecen de defectos metodológicos. Un número de células extraordinariamente pequeño, medios de suspensión celular inadecuados, volúmenes de inyección inaceptables, calibres de la aguja de inyección incompatibles con la supervivencia celular, y sobre todo, la falta de estudios que valoren las características morfológicas de la lesión medular, enormemente variable en la realidad de la práctica clínica, son detalles que se repiten con frecuencia en los estudios previamente publicados en este campo de investigación clínica y que en nuestra opinión condicionan tanto la gran variabilidad de resultados, como la confusión actual acerca de la utilidad real de estas nuevas técnicas.

Dentro de nuestro programa de investigación clínica para la discapacidad neurológica, este primer ensayo clínico se planteó como un estudio de bioseguridad, e intencionadamente quisimos conocer las posibilidades de obtener eficacia en pacientes con lesiones completas de larga evolución, lo que obviamente era un reto que se enfrentaba al dogma establecido de la irreversibilidad de la disfunción neurológica en este tipo de pacientes. No existe ningún estudio clínico hasta ahora en que se haya aplicado terapia celular a pacientes con una media de alrededor de 14 años desde el momento de su lesión neurológica (4 pacientes con más de 20 años de evolución). En estas condiciones era obvio que cualquier indicio de eficacia sería trascendente.

Por otra parte, como detalles distintivos e importantes, en comparación con otros estudios, hemos prestado, en el protocolo de nuestro ensayo, especial atención a:

- 1) Administración de altas dosis de células en un volumen mínimo, para no causar daño sobreañadido a la médula sana (concentración de 100.000 células/microlitro).
- 2) Suspensión de las células en un medio adecuado, derivado de plasma autólogo, como consecuencia de la experiencia obtenida en nuestros estudios previos *in vitro* y de la experiencia preclínica obtenida sobre nuestro modelo de cerdo adulto con paraplejia crónicamente establecida.
- 3) Envasado específico de nuestro medicamento NC1 y aplicación de las células mediante administración intralesional controlada con microinyector y microjeringa de Hamilton, lo que tuvo que ser justificado, y autorizado por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS).

- 4) Estudio exhaustivo de la lesión medular en cada paciente, lo que nos ha permitido una planificación quirúrgica de cada caso y una terapia celular “personalizada”, en función de las características de los diferentes tipos de lesión medular.

Con estas premisas de tratamiento, el análisis efectuado, independientemente de la ausencia de acontecimientos adversos relacionables con nuestra técnica de terapia celular, muestra que se ha obtenido eficacia terapéutica (mejoría clínica) en la totalidad de los pacientes tratados (100%).

## BIBLIOGRAFÍA

---

Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolano C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3908-3913.

Bakshi, A., Hunter. C., Swanger, S., Lepore, A., Fischer I., (2004). Minimally invasive delivery of stem cells for spinal cord injury: advantages of the lumbar puncture technique. *J. Neurosurg. Spine* 1, 330-337.

Bakshi, A., Barshinger, A.L., Swanger, S.A., Madhavani, V., Shumsky, J.S., Neuhuber, B., Fischer I., (2006). Lumbar puncture delivery of bone marrow stromal cells in spinal cord contusion: a novel method for minimally invasive cell transplantation. *J. Neurotrauma* 23, 55-65.

Baron-Van Evercooren A, Gansmüller A, Clerin E, and Gumpel M. (1991) Hoechst 33342 a suitable fluorescent marker for schwann cells after transplantation in the mouse spinal cord. *Neuroscience Letters* 131:241-244.

Basso DM, Beattie MS, Brennhahan JC (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12:1-21.

Bonilla, C., Zurita, M., Otero, L., Aguayo, J., Vaquero, J. (2009). Delayed intraslesional transplantation of bone marrow stromal cells increases endogenous neurogenesis and promotes functional improvement after severe traumatic brain injury. *Brain Inj.* 23: 760-769, 2009.

Chen, Q., Long, Y., Yuan, X., Zou, L., Sun, J., Chen, S., Pérez-Polo, J.R., Yang, K., (2005). Protective effects of bone marrow stromal cell transplantation in injured rodent brain: Synthesis of neurotrophic factors. *J Neurosci Res.* 80: 611-619.

Chopp, M., Zhang, X. H., Li, Y., Wang, L., Chen, J., Lu, D., Lu, M., Roseblum, M. (2000). Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 11, 3001-3005.

De Haro J, Zurita M, Ayllón L, Vaquero J. (2005) Detection of <sup>111</sup>In-oxine labeled-bone marrow stromal cells after intravenous or intralesional administration in chronic paraplegic rats. *Neurosci. Lett.* 377: 7-11.

Geffner, L.F., Santacruz, P., Izurieta, M., Flor, L., Maldonado, B., Auad, A.H., Montenegro, X., Gonzalez, R., Silva, F., (2008). Administration of autologous bone marrow stem cells into spinal cord injury patients via multiple routes is safe and improves their quality of life: Comprehensive case studies. *Cell Transplant.* 17, 1277-1293.

Himes, B.T., Neuhuber, B., Coleman, C., Kushner, R., Swanger, S.A., Kopen, G.C., Wagner, J., Shumsky, J.S., Fischer I., (2006). Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabil. Neural Repair* 20, 278-296.

Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, and Olson L. (2002) Marrow stromal cells from guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *PNAS* 99: 2199-2204.

Jiang PC, Xiong WP, Wang G, Ma C, Yao WQ, Kendell SF, Mehling BM, Yuan XH, Wu DC (2013). A clinical trial report of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in patients with spinal cord injury. *Exp Ther Med* 6, 140-146.

Johansson C, Momma S, Clark D, Risling M, Lendahl U, Frisen J. (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25-34.

Krogh K, Christensen P, Sabroe S, Laurberg S (2006). Neurogenic bowel dysfunction score. *Spinal Cord* 44: 625-631.

Li, H., When, Y., Luo, Y., Lan, X., Wang, D., Sun, Z., Hu, L. (2010). Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells into spinal cord injury: a comparison of delivery different times. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 24, 180-184 (In Chinese)

Liu, W., Jiang, X, Fu, X., Cui, S., Du, M., Cai, Y., Xu, R. (2008). Bone marrow stromal cells can be delivered to the site of traumatic brain injury via intrathecal transplantation in rabbits. *Neurosci. Lett.* 434, 160-164.

Mahmood, A., Lu, D., Wang, L., Li, Y., Lu, M., Chopp, M., (2001). Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* 49, 1196-1203.

Mendonça MVP, Larocca TF, Souza BS, Villarreal CF, et al, (2014). Safety and neurological assessments after autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in subjects with chronic spinal cord injury. *Stem Cell Research & Therapy* 5:126.

Nishida, H., Nakayama, M., Tanaka, H., Kitamura, M., Hatoya, S., Sugiura, K., Suzuki, Y., Ide C., Inaba, T. (2011). Evaluation of transplantation of autologous bone marrow stromal cells into the cerebrospinal fluid for treatment of chronic spinal cord injury in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 72, 1118-1123.

Ohta, M., Suzuki, Y., Noda, T., Ejiri, Y., Dezawa, M., Kataoka, K., Chou, H., Ishikawa, N., Matsumoto, N., Iwashita, Y., Mizuta, E., Kuno, S., Ide C., (2004). Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp. Neurol.* 187, 266-278.

Otero, L., Zurita, M., Bonilla, C., Aguayo, C., Rico, M.A., Rodríguez, A., Vaquero, J. (2012). Allogeneic bone marrow stromal cell transplantation after cerebral hemorrhage achieves cell differentiation and modulates endogenous neurogenesis. *Cytherapy*. 14: 34-44.

Pal, R., Venkataramana, N.K., Bansai, A., Balaraju, S., Ja,n M., Chandra, R, Dixit, A, Rauthan, A., Murgod, U., Toley, S. (2009). Ex vivo-expanded autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in human spinal cord injury/paraplegia: a pilot clinical study. *Cytherapy* 11, 897-911.

Park, J.H., Kim, D.Y, Sung, I. Y., Choi, G.H., Jeon, M.H., Kim, K.K., Jeon, S.R. (2012). Long-term results of spinal cord injury therapy using mesenchymal stem cells derived from bone marrow in humans. *Neurosurgery* 70, 1238-1247.

Parr, A.M., Tator, C.H., Keating, A., (2007). Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplant.* 40, 609-619.

Saito, F., Nakatani, T., Iwase, M., Maeda, Y., Hirakawa, A., Murao, Y., Suzuki, Y., Onodera, R., Fukushima, M., Chizuka, I., (2008). Spinal cord injury treatment with intrathecal autologous bone marrow stromal cell transplantation: The first clinical trial case report. *J Trauma.* 64, 53-59.

Saito, F., Nakatani, T., Iwase, M., Maeda, Y., Murao, Y., Suzuki, Y., Fukushima, M., Ide, C (2012). Administration of cultured autologous bone marrow stromal cells into



cerebrospinal fluid in spinal injury patients: a pilot study. *Restor. Neurol. Neurosci* 30, 127-136.

Satake, K., Lou, J., Lenke, L.G., (2004). Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine* 29, 1971-1979.

Syková, E., Homola, A., Mazanec, R., Lachmann, H., Konrádová, S.L., Kobylka, P., Pádr, R., Neuwirth, J., Komrska, V., Vávra, V., Stulik, J., Bojar, M., (2006). Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant.* 15, 675-687.

Vaquero J, Zurita M, Oya S, Santos M (2006) Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration? *Neurosci. Lett.* 398: 129-134.

Vaquero J, Zurita M. (2009). Bone marrow stromal cells for spinal cord repair: A challenge for contemporary neurobiology. *Histol. Histopathol.* 24, 107-116.

Vaquero, J., Zurita, M. (2011). Functional recovery after severe central nervous system trauma: Current perspectives for cell therapy with bone marrow stromal cells. *Progr. Neurobiol.* 93: 341-349.

Vaquero, J., Zurita, M. (2013). Cell transplantation in paraplegic patients: the importance of properly assessing the spinal cord morphology. *Clin. Transplant.* 27, 968-971.

Vaquero J, Zurita M, Rico MA, Bonilla C, Aguayo C, Montilla J, Bustamante S, Carballido J, Main E, Martinez F, Parajón A, Fernández C, De Reina L, and The Neurological Cell Therapy Group. An approach to personalized cell therapy in chronic complete paraplegia: The Puerta de Hierro phase I/II clinical trial. (2016) *Cytotherapy* 18: 1024-1035.

Wirth ED Reier PJ, Fessler RG, Thompson FJ, Uthman B, Behrman A, Beard J, Vierck CJ, Anderson DK (2001) Feasibility and Safety of Neural Tissue Transplantation in Patients with syringomyelia. *J Neurotrauma* 18: 911-929.

Yoon, S.H., Shim, Y.S., Park, Y.H., Chung, J.K., Nam, J.H., Kim, M.O., Park, H.C, Park, S.R., Min, B.H., Kim, E.Y., Choi, B.H., Park, H., Ha Y., (2007). Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. *Stem Cells* 25, 2066-2073.

Zurita M, Vaquero J, Oya S (2000) Grafting of neural tissue in chronically injured spinal cord: influence of the donor tissue on regenerative activity. *Surg Neurol* 54:117-25.

Zurita M, Vaquero J, Oya S, Montilla J (2001) Functional recovery in chronic paraplegic rats after co-grafts of fetal brain and adult peripheral nerve tissue. *Surg. Neurol.* 55: 249-254.

Zurita M, Vaquero J (2004) Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation. *NeuroReport* 15: 1105-1108.

Zurita M, Vaquero J (2006) Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: functional and morphological outcome one year after transplantation. *Neurosci. Lett.* 402: 51-56.

Zurita M, Vaquero J, Oya S, Miguel M (2005) Schwann cells induce neuronal differentiation of bone marrow stromal cells. *NeuroReport* 16: 505-508.

Zurita, M., Vaquero, J., Bonilla, C., Santos, M., De Haro, J., Oya, S., Aguayo, C. (2008). Functional recovery of chronic paraplegic pigs after autologous transplantation of bone marrow stromal cells. *Transplantation* 86, 845-853.

Zurita M, Aguayo, C., Bonilla, C., Otero, L., Rico, M., Rodríguez A, Vaquero, J., (2012). The pig model of chronic paraplegia: A challenge for experimental studies in spinal cord injury. *Progr. Neurobiol.* 97, 288-303.

Zurita, M., Aguayo, C., Bonilla, C., Rodriguez, A., Vaquero, J. (2013). Perilesional intrathecal administration of autologous bone marrow stromal cells achieves functional improvement in pigs with chronic paraplegia. *Cytotherapy* 2013, 15: 1218-1227.