

Estudio de la diferenciación *in vitro* de progenitores ependimarios en condiciones de hidrocefalia posthemorrágica y en cotrasplante con células madre mesenquimales

Study on the ependymal progenitor *in vitro* differentiation in posthaemorrhagic hydrocephalus and in co-transplantation with mesenchymal stem cells

Trabajo Fin de Grado en Bioquímica
Universidad de Málaga

Autor: Javier López de San Sebastián

Área de conocimiento y Departamento: Área de Biología Celular; Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología

Fecha de presentación: Junio de 2023

Tema: Terapia mediante células madre en la hidrocefalia

Tipo: Trabajo de iniciación a la investigación

Modalidad: Individual

Nº de páginas de la memoria: 40

Nº de páginas de los anexos: 7

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DEL TFG

D./Dña. Javier López de San Sebastián, con DNI (NIE o pasaporte) [REDACTED]
estudiante del Grado en Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de
Málaga,

DECLARO:

Que he realizado el Trabajo Fin de Grado titulado "Estudio de la diferenciación *in vitro* de progenitores endodermarios en condiciones de hidrocefalia posthemorrágica y en cotrasplante con células madre mesenquimales" y que lo presento para su evaluación. Dicho trabajo es original y todas las fuentes bibliográficas utilizadas para su realización han sido debidamente citadas en el mismo.

De no cumplir con este compromiso, soy consciente de que, de acuerdo con la Normativa reguladora de los procesos de evaluación de los aprendizajes del estudiantado de la Universidad de Málaga de 23 de julio de 2019, esto podrá conllevar la calificación de suspenso en la asignatura, sin perjuicio de las responsabilidades disciplinarias en las que pudiera incurrir en caso de plagio.

Para que así conste, firmo la presente en Málaga, el 29 de mayo del 2023

Fdo: Javier López de San Sebastián

LOPEZ DE SAN
SEBASTIAN
JAVIER -
[REDACTED]

Firmado digitalmente
por LOPEZ DE SAN
SEBASTIAN JAVIER -
[REDACTED]
Fecha: 2023.05.29
14:28:05 +02'00'

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN	1
El neuroepitelio, la glía radial y el epéndimo. La matriz germinal .	1
El sistema ventricular del encéfalo	7
La hidrocefalia	8
Las hemorragias intraventriculares y de la matriz germinal y la hidrocefalia posthemorrágica	10
El tratamiento de la hidrocefalia posthemorrágica	13
Las células madre: concepto y aplicación en el tratamiento de la hidrocefalia posthemorrágica	14
OBJETIVOS	16
MATERIAL Y MÉTODOS	16
Animales de experimentación	16
Obtención de PEp para trasplante	16
Obtención de CMM para trasplante	18
Experimento de diferenciación de PEp en condiciones hemorrágicas y con trasplante de CMM	19
Inducción de la HMG/HIV y la HPH	21
Cultivos organotípicos de explantes de pared ventricular	22
Trasplante de PEp y CMM en explantes de pared ventricular. Análisis de la diferenciación de los PEp.....	24
Toma y análisis de imágenes	25
Análisis estadísticos	26
RESULTADOS	27
Maduración de los PEp en condiciones de HMG/HPH <i>in vitro</i>	27
Efecto de las CMM en la maduración del epéndimo <i>in vitro</i>	29

Efecto de las CMM en el restablecimiento de la diferenciación del epéndimo en condiciones de HMG/HPH	30
Generación de las HMG/HPH moderada y severa en ratones	31
Efecto del trasplante de PEp y CMM en explantes de pared ventricular afectada por HMG/HPH	31
DISCUSIÓN	34
Efecto de las condiciones hemorrágicas presentes en la HPH sobre la diferenciación de los PEp	34
Efecto del ambiente de cocultivo con CMM en la supervivencia y diferenciación de los PEp	38
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXOS	53
Anexo A: soluciones	53
Anexo B: medios y protocolos para cultivos celulares	55
Anexo C: inmunofluorescencia. Anticuerpos y protocolos	58

Estudio de la diferenciación in vitro de progenitores ependimarios en condiciones de hidrocefalia posthemorrágica y en cotrasplante con células madre mesenquimales

RESUMEN

El epéndimo es el epitelio que recubre las paredes del sistema ventricular cerebral, y cumple importantes funciones relacionadas con el mantenimiento y homeostasis del sistema nervioso central. Por su ubicación, el epéndimo es un tejido que sufre de forma directa las consecuencias de las hemorragias en la matriz germinal y las hemorragias que drenan hacia el interior del ventrículo, que con frecuencia desembocan en hidrocefalia posthemorrágica. El objetivo de este trabajo de investigación fue elucidar el efecto que las condiciones presentes durante las hemorragias en la matriz germinal e intraventriculares tienen en la diferenciación de los progenitores ependimarios hacia epéndimo. Asimismo, se estudió el posible efecto terapéutico que la aplicación de células madre mesenquimales pudiera tener sobre el epéndimo en desarrollo en esas mismas condiciones. Se ha detectado que la sangre, el suero sanguíneo y el TNF α interfieren negativamente con la diferenciación ependimaria, mientras que las células madre mesenquimales la favorecen. Además, se ha determinado que las células madre mesenquimales incrementaron la supervivencia de progenitores ependimarios cuando ambas células fueron trasplantadas sobre explantes de pared ventricular afectados por hemorragias en la matriz germinal e intraventriculares. En conclusión, se estima que las células madre mesenquimales y los progenitores ependimarios son poderosas herramientas que merecen ser consideradas en el diseño de terapias para la hidrocefalia posthemorrágica.

Palabras clave:

Epéndimo, hidrocefalia posthemorrágica, células madre mesenquimales, terapia celular, Foxj1, cilios.

Study on the ependymal progenitor in vitro differentiation in post-haemorrhagic hydrocephalus and in co-transplantation with mesenchymal stem cells

ABSTRACT

The ependyma is the epithelium which covers the brain ventricular system walls and exerts relevant functions related to central nervous system maintenance and homeostasis. Due to its location, ependyma suffers direct damage from the germinal matrix and intraventricular haemorrhages, which frequently lead to post-haemorrhagic hydrocephalus. This research was aimed to uncover the effect of germinal matrix haemorrhages and intraventricular haemorrhages conditions on ependymal differentiation. In addition, the probable beneficial effects of mesenchymal stem cells on the developing ependyma were tested. It was found that whole blood, blood serum and TNF α impaired ependymal differentiation, whereas mesenchymal stem cells enhanced it. In addition, it was determined that mesenchymal stem cells promoted ependymal progenitor survival when both cell types were transplanted over ventricular wall explants affected by germinal matrix and intraventricular haemorrhage. In conclusion, mesenchymal stem cells and ependymal progenitors can be considered promising for designing therapies to tackle post-haemorrhagic hydrocephalus.

Keywords:

Ependyma, post-haemorrhagic hydrocephalus, mesenchymal stem cells, stem cell therapy, Foxj1, cilia.

LISTA DE ABREVIATURAS

- CMM células madre mesenquimales
- DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DMEM medio Eagle modificado de Dulbecco
- EDTA ácido etilendiaminotetraacético
- FBS suero fetal bovino
- Foxj1 *Forkhead box J1*
- HIV hemorragia intraventricular
- HMG hemorragia en la matriz germinal
- HPH hidrocefalia posthemorrágica
- IL-10 interleuquina 10
- IKK2, IKK β *Inhibitor of nuclear factor Kappa-B Kinase, subunit beta*
- LCR líquido cefalorraquídeo
- NF- κ B *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
- PB tampón fosfato
- PBS tampón fosfato salino
- PEp progenitores ependimarios
- PRX2 peroxiredoxina 2
- SNC sistema nervioso central
- TFG β factor de crecimiento transformante β
- TLR4 receptor Toll-like 4
- TNF α factor de necrosis tumoral α
- TNFR1 receptor 1 de TNF
- TNFR2 receptor 2 de TNF

INTRODUCCIÓN

El neuroepitelio, la glía radial y el epéndimo. La matriz germinal.

El tubo neural está tapizado por el neuroepitelio, que consiste en un epitelio pseudoestratificado monociliado bipolar que ocupa todo el grosor de la pared del tubo neural (Malatesta *et al.*, 2008) (Figura 1). Las células del neuroepitelio darán lugar a casi todos los tipos celulares presentes en el sistema nervioso central (SNC) (Jiménez *et al.*, 2014), a excepción de las células microgliales, cuyo origen está sujeto a controversia, aunque se sabe que no se origina a partir del ectodermo (Ginhoux y Prinz, 2015). Alrededor de los días 9 y 10 de gestación en el ratón y de la semana 10 en el humano las células del neuroepitelio se convierten en la denominada glía radial (Gould *et al.*, 1990; A. Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009) (Figura 2).

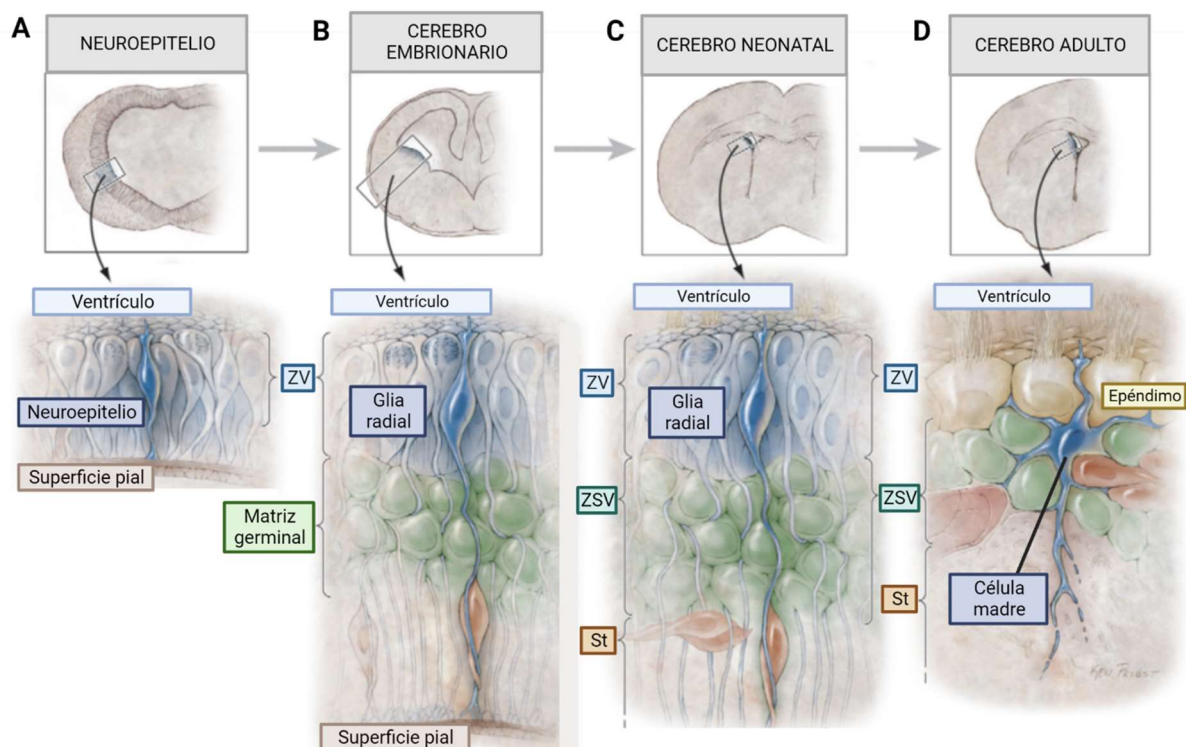


Figura 1. Diferenciación del epéndimo en relación con las zonas ventricular y subventricular del ventrículo lateral en el ratón. (A) Se representa el estado inicial del desarrollo del SNC, cuya zona ventricular (ZV) está compuesta exclusivamente por células del neuroepitelio, que conforman un epitelio pseudoestratificado monociliado que contacta simultáneamente con el ventrículo y la superficie pial. **(B)** Durante la mayor parte del desarrollo embrionario, la ZV está poblada de células

de la glía radial, que mantiene las características morfológicas del neuroepitelio. También aparece la matriz germinal en la zona inmediatamente inferior a la zona ventricular, con abundantes progenitores neuronales, oligodendrogénicos y astrogliogénicos que participan en histogénesis de la corteza cerebral. **(C)** En el ratón neonato el lugar antes ocupado por la matriz germinal pasa a denominarse zona subventricular (ZSV). La ZSV mantiene actividad gliogénica y neurogénica. También se dan los primeros indicios de diferenciación de las células de la glía radial en células del epéndimo. **(D)** En el SNC del ratón adulto la glía radial ha desaparecido y la ZV está completamente compuesta de epéndimo. En determinadas regiones exclusivas del ventrículo lateral, algunas células de la glía radial permanecen como células madre adultas en la ZSV. Las células madre adultas siguen manteniendo su contacto con el ventrículo y el LCR mediante una prolongación citoplasmática que presenta un solo cilio, formando junto con el epéndimo los nichos neurogénicos y gliogénicos en el adulto. Abreviaturas: ZV (zona ventricular), ZSV (zona subventricular), St (estriado). Modificado de Merkle y Alvarez-Buylla, 2006. Creado con BioRender.com.

La glía radial mantiene una morfología similar al neuroepitelio: la porción apical contacta con el lumen del tubo neural y es monociliada. Sin embargo, su región basal presenta una prolongación que contacta con la superficie pial en la zona marginal del SNC en desarrollo (Angevine *et al.*, 1970; Howard *et al.*, 2008; A. Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). El cuerpo celular de la glía radial, por su parte, reside en la zona ventricular (A. R. Kriegstein y Götz, 2003), definida como la región inmediatamente adyacente a la cavidad ventricular tanto del SNC en desarrollo como del SNC adulto (Angevine *et al.*, 1970) (Figura 1).

Las células de la glía radial presentan características de células madre. Pueden autorrenovarse y dan lugar a intermediarios neurogénicos y gliogénicos (Howard *et al.*, 2008; Noctor *et al.*, 2004; Zecevic, 2004). Los intermediarios neurogénicos y gliogénicos migran a la zona subventricular, región subyacente a la zona ventricular, para ejercer su función como progenitores de neuronas y células gliales (Noctor *et al.*, 2008) (Figura 2).

Finalmente, una subpoblación de la glía radial se diferencia de forma terminal en epéndimo, epitelio constituido principalmente por células que son multiciliadas en su parte apical y que recubren el sistema ventricular del SNC adulto (Merkle y Alvarez-Buylla, 2006; Mirzadeh, Han, *et al.*, 2010) (Figura 1). La subpoblación de la glía radial que da lugar a las células endimarias multiciliadas se caracteriza por expresar el factor de transcripción *forkhead box J1* (Foxj1), momento en el que se definen como

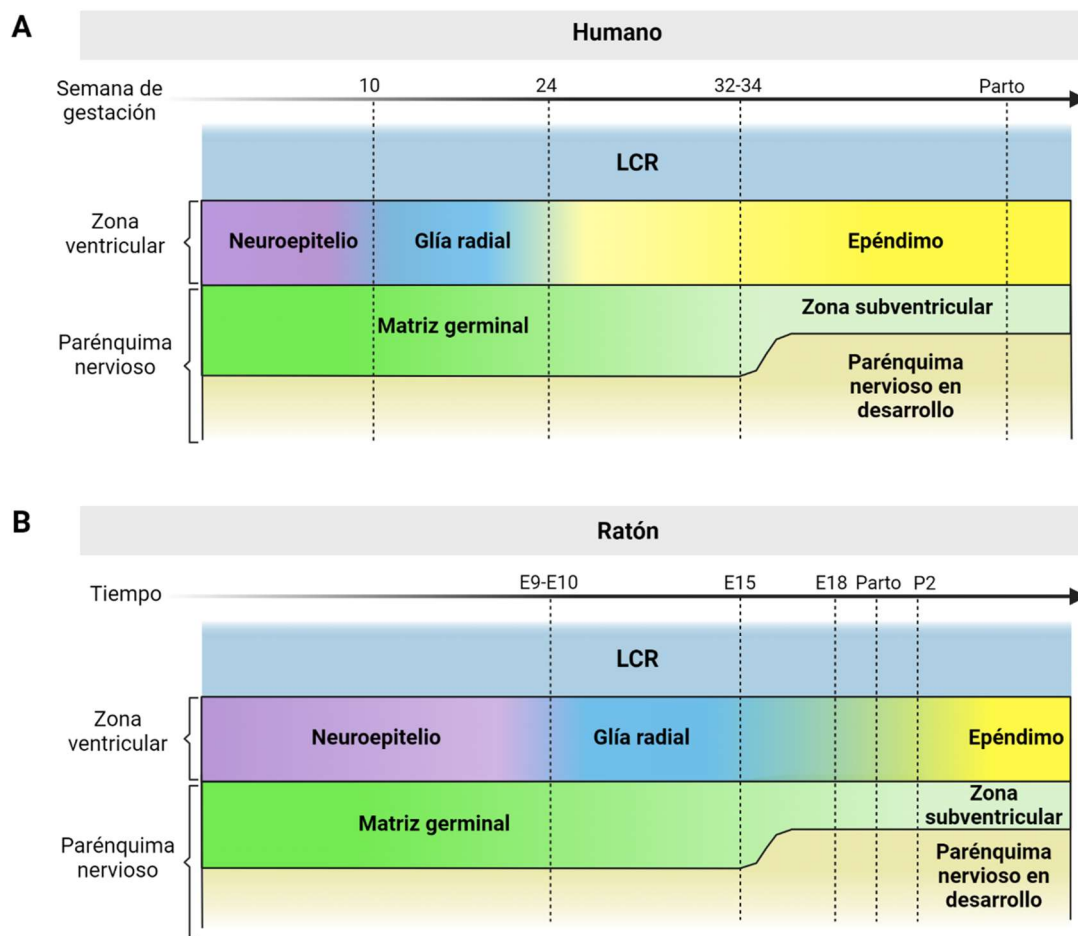


Figura 2. Línea temporal comparativa de los cambios que sufren la zona ventricular y el tejido subyacente a nivel del ventrículo lateral. En la figura se muestran dos esquemas, uno relativo al **(A)** humano y otro relativo al **(B)** ratón. Ambos esquemas ilustran a modo orientativo los distintos tipos celulares que pueblan secuencialmente la zona ventricular, en contacto directo con el LCR, así como la evolución de la matriz germinal que se ubica bajo la zona ventricular y la aparición de la zona subventricular. Los tiempos representados son orientativos, puesto que la diferenciación del tejido nervioso ocurre más tardíamente en las porciones rostrales del SNC, por lo que es de esperar variabilidad según la zona del ventrículo lateral. En el panel **(B)**, en lo referido a la línea temporal, los números precedidos de “E” indican días de gestación (embrionarios), mientras que el precedido por “P” indica días transcurridos tras el parto (postnatales). Figura de elaboración propia. Creado con BioRender.com.

progenitores endimarios (PEp), antes de comenzar la ciliogénesis (Jacquet *et al.*, 2009). Esto ocurre alrededor de la semana 24 en humanos en las porciones ventriculares posteriores (Sarnat, 1992). En el caso del ratón, la diferenciación de glía radial en epéndimo en los ventrículos laterales ocurre más tardíamente, entre el día 18 de gestación y el día 2 postnatal (Spassky *et al.*, 2005) (Figura 2). Cabe mencionar que la gestación del ratón dura entre 18 y 22 días, siendo en la cepa C57/BL-6J de 19 días de media (Murray *et al.*, 2010).

Al final del desarrollo embrionario, en una región concreta de los ventrículos laterales, una subpoblación de la glía radial permanece como células madre cuyo soma se localiza en la zona subventricular. Sin embargo, extienden su porción apical hacia el ventrículo, donde presentan un único cilio (Merkle y Alvarez-Buylla, 2006) (Figura 1). Visto desde el ventrículo cerebral, las células madre aparecen en grupos de células monociliadas rodeadas de células endimarias multiciliadas, formando unas organizaciones a modo de molinillos (pinwheels), que constituyen los nichos neurogénicos y gliogénicos de la región ventricular (Mirzadeh *et al.*, 2008). Estas células madre, durante la vida adulta, se encuentran bajo una estrecha regulación ejercida por el microambiente del nicho en el que se ubican, cuyo componente esencial es la célula endimaria multiciliada (Benner *et al.*, 2013; Paez-Gonzalez *et al.*, 2011) (Figuras 1 y 3).

El epéndimo es un epitelio simple prismático (Bruni *et al.*, 1985) cuyas células más abundantes presentan microvellosidades y un gran penacho de cilios móviles en su parte apical, contactando con el líquido cefalorraquídeo (LCR) contenido en la cavidad ventricular (Wolburg *et al.*, 2009). Como epitelio, posee su propia lámina basal entre su membrana basolateral y el parénquima nervioso y glial que recubre, aunque es rudimentaria y no muy evidente (Del Bigio, 2010). Además de presentar una polaridad basoapical, el epéndimo manifiesta una polaridad planar relacionada con el control de la dirección del batido ciliar, que en última instancia controla el movimiento del LCR (Kishimoto y Sawamoto, 2012; Marshall, 2010; Mirzadeh, Han, *et al.*, 2010).

El epéndimo, lejos de ser una barrera pasiva entre el ventrículo y el parénquima nervioso, lleva a cabo funciones clave en el mantenimiento de la homeostasis y el funcionamiento del tejido nervioso. Entre estas funciones se pueden encontrar la regulación del intercambio de agua e iones y su homeostasis (Jiménez *et al.*, 2014;

MacAulay y Zeuthen, 2010; Venero *et al.*, 1999), el transporte paracelular (Whish *et al.*, 2015) y la concentración de péptidos reguladores (Del Bigio, 1995; Gee *et al.*, 1993); protección frente a infecciones (Canova *et al.*, 2006; Chakravarty y Herkenham, 2005; Deckert-Schlüter *et al.*, 1994; Delhaye *et al.*, 2006; Neal y Gasque, 2013) y moléculas lesivas (Del Bigio, 1995; Fagan y Perrin, 2012; Nelles y Hazrati, 2022); el soporte metabólico al tejido adyacente (Del Bigio, 2010); y el mantenimiento de la neurogénesis subventricular (Lim *et al.*, 2000; Paez-Gonzalez *et al.*, 2011; Peretto *et al.*, 2004) (Figura 3).

Un concepto estrechamente relacionado con el neuroepitelio, la glía radial y el epéndimo es el de matriz germinal. La matriz germinal es la región del parénquima nervioso ubicado bajo la zona ventricular y en la que se identifican un elevado número de figuras mitóticas (Tramontin *et al.*, 2003). La matriz germinal es la región en la que tiene lugar gran parte de la neurogénesis y la gliogénesis durante el desarrollo embrionario (Doetsch *et al.*, 1997; Leijser y de Vries, 2019; Tsitouras y Sgouros, 2011). Esto es debido a la gran cantidad de células progenitoras (Ballabh, 2014; Paredes *et al.*, 2022; Sanai *et al.*, 2011) con gran actividad mitótica (Tramontin *et al.*, 2003) que contiene. La matriz germinal en humanos pierde actividad mitótica a partir de la semana 32-34 (Sanai *et al.*, 2011), mientras que en ratón ocurre alrededor del día 15 de gestación (A. Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). La zona ventricular, por su parte, está comprendida secuencialmente en el tiempo por el neuroepitelio, la glía radial y el epéndimo conforme avanza el desarrollo, y que como indica su nombre, se encuentra adyacente a la cavidad de los ventrículos (Figuras 1 y 2).

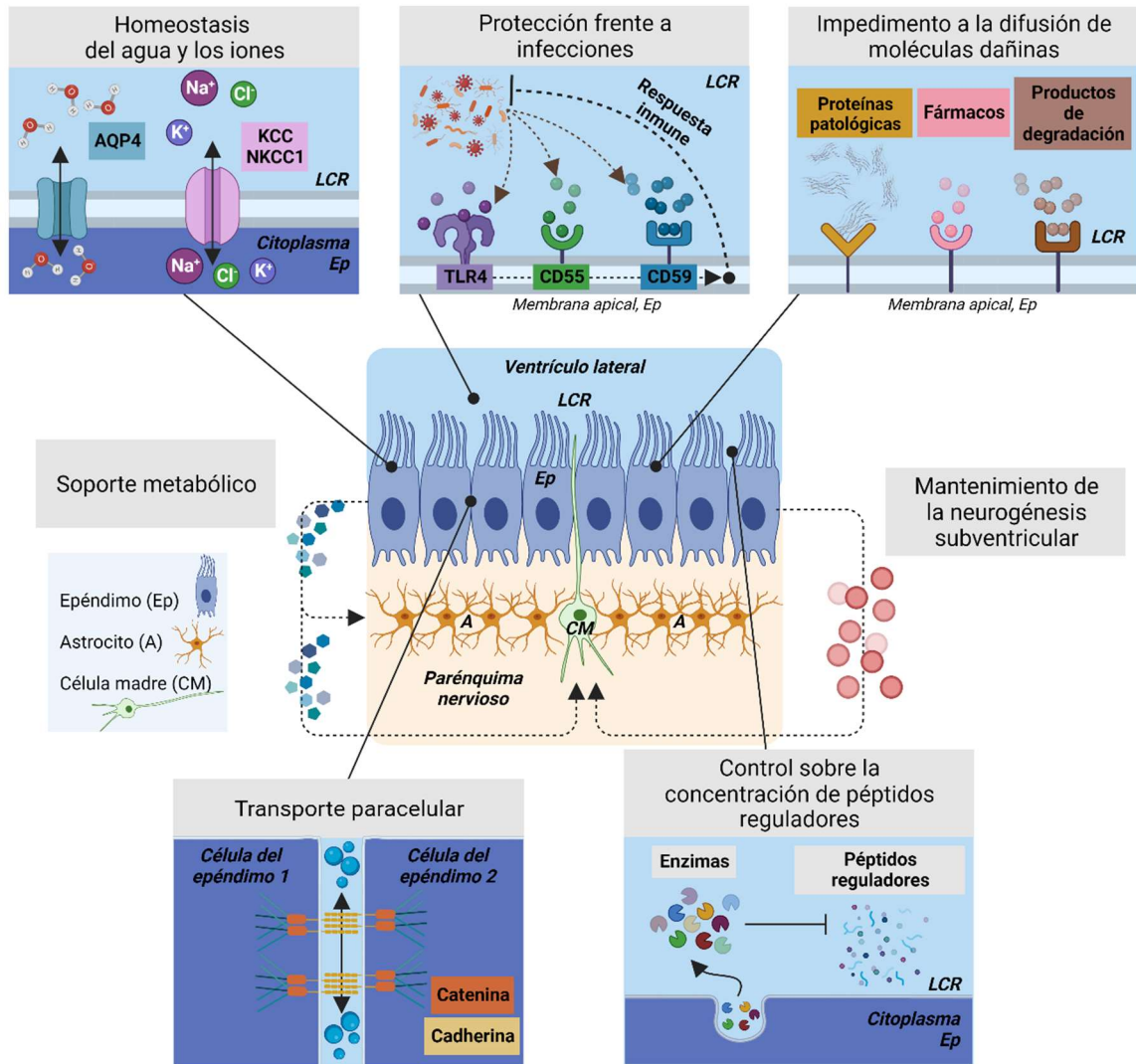


Figura 3. Esquema ilustrativo de las funciones desempeñadas por el epéndimo. Superior izquierda. El epéndimo participa en la homeostasis del agua y los iones mediante la expresión de canales de agua, como la acuaporina 4 (AQP4), y de transportadores iónicos como el cotransportador potasio-cloruro (KCC) y el cotransportador sodio-potasio-cloruro 1 (NKCC1). **Superior centro.** El epéndimo es capaz de iniciar una respuesta inmune frente a infecciones procedentes del LCR gracias a la expresión en su membrana apical de receptores como el Toll-like 4 (TLR4), CD55 y CD59. Estos receptores son capaces de responder a patrones moleculares procedentes de virus y bacterias. **Superior derecha.** El epéndimo puede capturar proteínas patológicas, fármacos y productos de degradación mediante receptores ubicados en su membrana apical, de forma que se evita su difusión hacia el parénquima nervioso. **Centro izquierda.** El epéndimo provee de sustratos metabólicos a los astrocitos y a las células madre que se encuentran bajo la zona ventricular. **Centro derecha.** El epéndimo es necesario para el correcto desarrollo de la neurogénesis ventricular. **Inferior izquierda.** Las células del epéndimo carecen de uniones estrechas pero presentan uniones adherentes, lo que permite el transporte paracelular entre el LCR y el tejido nervioso adyacente. **Inferior derecha.** Mediante la exocitosis de enzimas, el epéndimo es capaz de regular la concentración de péptidos reguladores como factores de crecimiento, hormonas,

quimiocinas y neuropéptidos, de forma que se eviten posibles efectos deletéreos sobre el tejido nervioso. Abreviaturas: A (astrocito), CM (célula madre), Ep (epéndimo), LCR (líquido cefalorraquídeo). Figura de elaboración propia. Creado con BioRender.com.

El sistema ventricular del encéfalo

El sistema ventricular encefálico de los mamíferos adultos se compone de cuatro cavidades interconectadas rellenas de LCR (Korzh, 2018; Lowery y Sive, 2009; Mortazavi *et al.*, 2014), fluido producido mayoritariamente por el plexo coroideo que se ubica dentro de las citadas cavidades (Jessen *et al.*, 2015). Las cuatro cavidades son (i) el ventrículo lateral derecho y (ii) el ventrículo lateral izquierdo, denominados conjuntamente como ventrículos laterales (VL); (iii) el tercer ventrículo y (iv) el cuarto ventrículo (Pérez-Fígares *et al.*, 2001). La cavidad ventricular proviene de la cavidad original del tubo neural tras sufrir expansiones en volumen y pliegues hasta adquirir la forma que se observa en el sistema ventricular del encéfalo adulto (Mortazavi *et al.*, 2014).

La forma del sistema ventricular adulto, sin embargo, varía entre los mamíferos, aunque comparten ciertas características (Figura 4). En todos los mamíferos se encuentran dos ventrículos laterales con forma arqueada, cada uno de ellos en un hemisferio cerebral y que constituyen las mayores cavidades de todo el sistema ventricular, y donde mayor cantidad de LCR se produce. Los ventrículos laterales están conectados a través de los forámenes de Monro con el tercer ventrículo, ubicado en la línea media, en el diencefalo. El tercer ventrículo y el cuarto ventrículo están conectados por el acueducto cerebral o acueducto de Silvio. El cuarto ventrículo, por su parte, también se ubica en la línea media, esta vez entre el tronco cerebral y el cerebelo, y presenta aberturas que permiten la salida del LCR del sistema ventricular, como son el foramen de Magendie y los forámenes de Lushka (Korzh, 2018; Mortazavi *et al.*, 2014; Moyes, 1968; Pérez-Fígares *et al.*, 2001). Adicionalmente, el cuarto ventrículo se abre por su parte caudal al canal central medular, que discurre a lo largo de la médula espinal, aunque éste suele obliterarse en humanos tras el nacimiento (Pérez-Fígares *et al.*, 2001; Saker *et al.*, 2016).

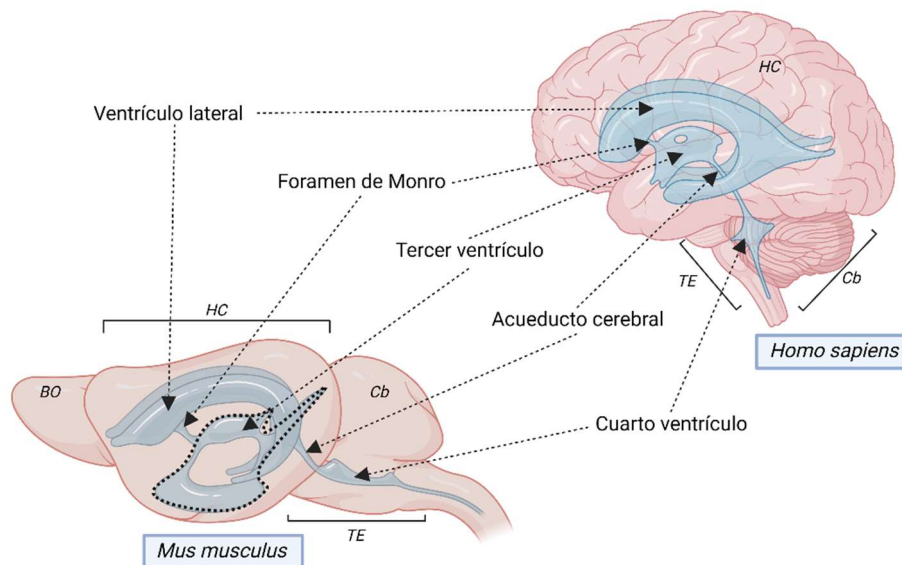


Figura 4. Anatomía comparada del sistema ventricular del ratón y del humano. Vista lateral izquierda de un encéfalo humano (*Homo sapiens*) y un encéfalo de ratón (*Mus musculus*) donde se muestra la ubicación y forma de sus respectivos sistemas ventriculares. Ambos sistemas ventriculares poseen las mismas cavidades y conductos, aunque la forma de éstos varía significativamente. En el caso del ratón la línea punteada denota el conjunto de cavidades que conforman su tercer ventriculo. Abreviaturas: BO (bulbo olfatorio), Cb (cerebelo), HC (hemisferio cerebral), TE (tronco encefálico: mesencéfalo, protuberancia y médula oblongada). Figura de elaboración propia. Creado con BioRender.com.

La hidrocefalia

La hidrocefalia se puede definir como la dilatación patológica de los ventrículos del SNC como consecuencia de la acumulación patológica de LCR en el sistema ventricular (Kahle *et al.*, 2016; McAllister, 2012). La hidrocefalia es una condición que se estima que afecta a entre 0,5 y 1 niños y niñas por cada 1000 nacimientos (McAllister, 2012; Tully y Dobyns, 2014). Las consecuencias más reconocibles de esta patología son la macrocefalia y el aumento de la presión intracraneal (Kahle *et al.*, 2016).

En cuanto a la clasificación clínica de la hidrocefalia existen tres clasificaciones bastante extendidas y no mutuamente excluyentes. Las clasificaciones atienden a (i) si se da una presencia o ausencia de comunicación entre las diferentes cavidades del sistema ventricular (Kahle *et al.*, 2016; Mori, 2000), (ii) si la hidrocefalia se produce

por una causa genética o adquirida (Kahle *et al.*, 2016; McAllister, 2012), o (iii) si la hidrocefalia se da antes o después del nacimiento (Mori, 2000).

En lo relativo a la primera clasificación, se habla de hidrocefalia no comunicante (también denominada obstructiva) cuando existe un impedimento al flujo del LCR a través de las cavidades y conductos del sistema ventricular por causas varias, entre ellas tumores, quistes y obliteraciones de conductos (Kahle *et al.*, 2016). En ella, la obstrucción más común se da a nivel del acueducto de Silvio (H. C. Jones y Bucknall, 1988; Pérez-Fígares *et al.*, 2001). Paralelamente, se refiere como hidrocefalia comunicante (no obstructiva) a aquella que no presenta ninguna obstrucción al flujo natural del LCR, pero que cursa con una hiperproducción o falta de resorción de este (Kahle *et al.*, 2016; McAllister, 2012). Esta clasificación, sin embargo, ha sido cuestionada, en base a que toda ventriculomegalia desembocaría en última instancia en la obstrucción del flujo del LCR (Ransohoff *et al.*, 1960; Rekate, 2008).

En segundo lugar, se distinguen las formas genéticas y, por oposición, adquiridas de la hidrocefalia (Kahle *et al.*, 2016; McAllister, 2012). Las formas genéticas de la hidrocefalia se pueden atribuir mayormente a malformaciones o defectos en el desarrollo del tubo neural, por lo que suelen ser eminentemente obstructivas (Kahle *et al.*, 2016). Son ejemplos de hidrocefalia de etiología genética las hidrocefalias asociadas al cromosoma X, la malformación de Dandy-Walker, la acondroplasia o la malformación de Arnold-Chiari (Malagón-Valdez, 2006). Por otra parte, las adquiridas son causadas por infecciones, hemorragias o traumatismos, entre otras causas (Mori, 2000).

La tercera clasificación hace referencia a si la hidrocefalia es congénita (anterior al nacimiento) o postnatal (posterior al nacimiento), pudiéndose encontrar combinadas con los tipos de hidrocefalia mencionados en los párrafos anteriores (Mori, 2000).

Son, en suma, estos tres factores, disminución de la absorción, hiperproducción, y obstrucción al flujo de LCR, los que pueden ser considerados como los tres hechos principales que pueden desembocar en el desarrollo de la hidrocefalia (Moyes, 1968).

Las consecuencias a largo plazo de la hidrocefalia son variadas, pues dependen en gran medida del agente causal de las mismas y de las circunstancias clínicas particulares de cada individuo (Kahle *et al.*, 2016). Entre ellas se encuentran

un menor desarrollo intelectual (Lacy *et al.*, 2008), problemas en la navegación espacial (Smith y Buckley, 2012) y disminución de la función ejecutiva (Lacy *et al.*, 2012; Lindquist *et al.*, 2008), del aprendizaje y de la memoria (Lindquist *et al.*, 2008). También se estima que el 34 % de los pacientes hidrocefálicos padecen epilepsia (Kulkarni, 2010). Como conclusión, se calcula que alrededor del 80 % de los pacientes que sufren hidrocefalia tienen algún tipo de merma en su calidad de vida (Kulkarni, 2010).

Los tratamientos actuales de la hidrocefalia son de base quirúrgica. Se resumen en la ventriculostomía endoscópica del tercer ventrículo y en la derivación ventriculoperitoneal. La ventriculostomía endoscópica pretende solventar la falta de comunicación entre ventrículos practicando una perforación en el suelo del tercer ventrículo (su pared ventral) para que se abra con la cisterna prepontina, de forma que el exceso de LCR pueda evacuarse por dicha apertura (R. F. Jones *et al.*, 1990; Kahle *et al.*, 2016). Adicionalmente, suele combinarse con la cauterización del plexo coroideo para reducir la producción de LCR, de forma que ambas intervenciones contribuyan sinérgicamente a la recuperación del paciente (Pople y Ettles, 1995; Warf, 2005). Por su parte, la derivación ventriculoperitoneal consiste en la inserción de una cánula permanente en el ventrículo lateral que permite el drenaje continuo del exceso de LCR hacia la cavidad peritoneal (Kahle *et al.*, 2016), aunque también se puede derivar hacia otras regiones, como la aurícula derecha, recibiendo en este caso el nombre de derivación ventrículoatrial (Moyes, 1968). Sin embargo, las derivaciones del LCR mediante cánulas sufren numerosas complicaciones, dado que entre el 30-40 % fallan durante el primer año tras realizar la intervención, cifra que se eleva hasta el 50 % durante el segundo año de implantación (McAllister, 2012).

Las hemorragias intraventriculares y de la matriz germinal y la hidrocefalia posthemorrágica

La matriz germinal es un tejido altamente vascularizado. En recién nacidos prematuros se dan con cierta incidencia hemorragias de la matriz germinal (HMG) (Ballabh, 2014; Volpe, 1989). Cuando la hemorragia alcanza y penetra en el ventrículo lateral se denomina hemorragia intraventricular (HIV) y afecta al 20 % de los neonatos prematuros (Ballabh, 2010). Hay diversos factores que condicionan la aparición de

HMG/HIV en niños prematuros, como un flujo sanguíneo elevado o interrumpido, la fragilidad vascular inherente a los vasos sanguíneos de la matriz germinal (debido a una abundante angiogénesis y a la ausencia de uniones estrechas entre células endoteliales, lámina basal y contacto con células gliales), así como los partos vía vagina, la hipoxia, los desórdenes de coagulación y las convulsiones (Ballabh, 2010; Luo *et al.*, 2019; Volpe, 1989) (Figura 5).

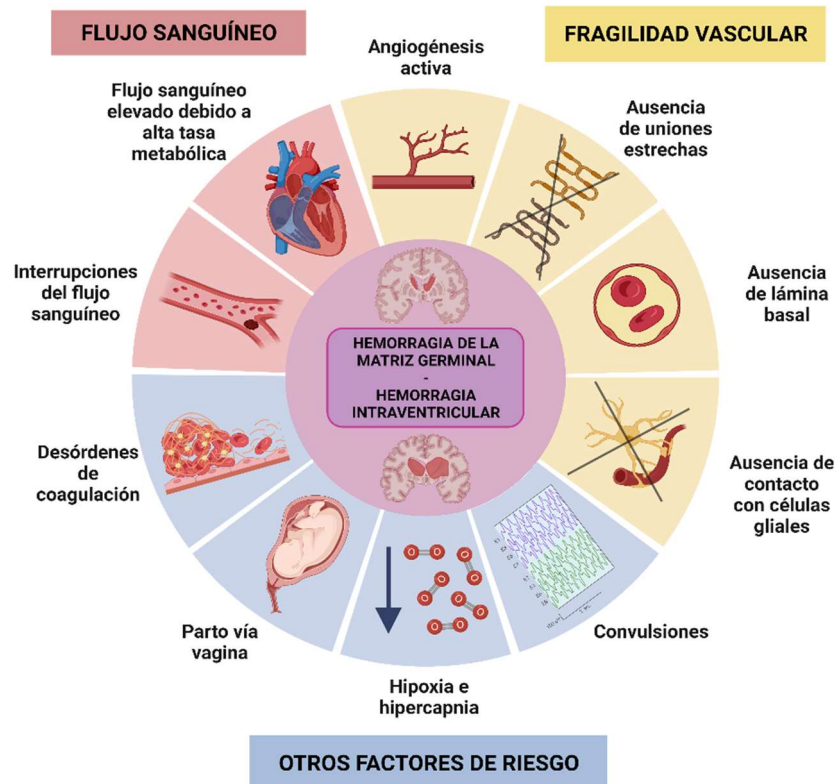


Figura 5. Factores de riesgo que condicionan la aparición de hemorragias de la matriz germinal y hemorragias intraventriculares. Los factores de riesgo se han agrupado en tres categorías en función de si tienen relación con el flujo sanguíneo en la matriz germinal (**rojo**), con la fragilidad vascular de los vasos sanguíneos de la matriz germinal (**amarillo**) o si bien constituyen otra serie de factores de riesgo diferentes (**azul**). Figura de elaboración propia. Creado con BioRender.com.

Con el fin de clasificar clínicamente la severidad de la HMG/HIV, se han postulado varias clasificaciones. Dos de las más extendidas son la de Volpe (Volpe, 1989) y la de Papile (Papile *et al.*, 1978). Ambas gradan la HMG/HIV en función de si la hemorragia invade los ventrículos laterales y en caso de hacerlo, la extensión del ventrículo que ocupa. La principal diferencia radica en que la clasificación de Papile establece cuatro grados (I-IV) (Papile *et al.*, 1978) mientras que la de Volpe lo hace

en tres (I-III) (Volpe, 1989). Esto es debido a que Volpe considera que el estadio IV de Papile corresponde a otra patología distinta (Volpe, 1989; Volpe *et al.*, 2018). Se ilustra la clasificación de Papile en la Figura 6. Otras clasificaciones más recientes y menos extendidas son la clasificación europea (Parodi *et al.*, 2020) y la canadiense (Mohammad *et al.*, 2021).

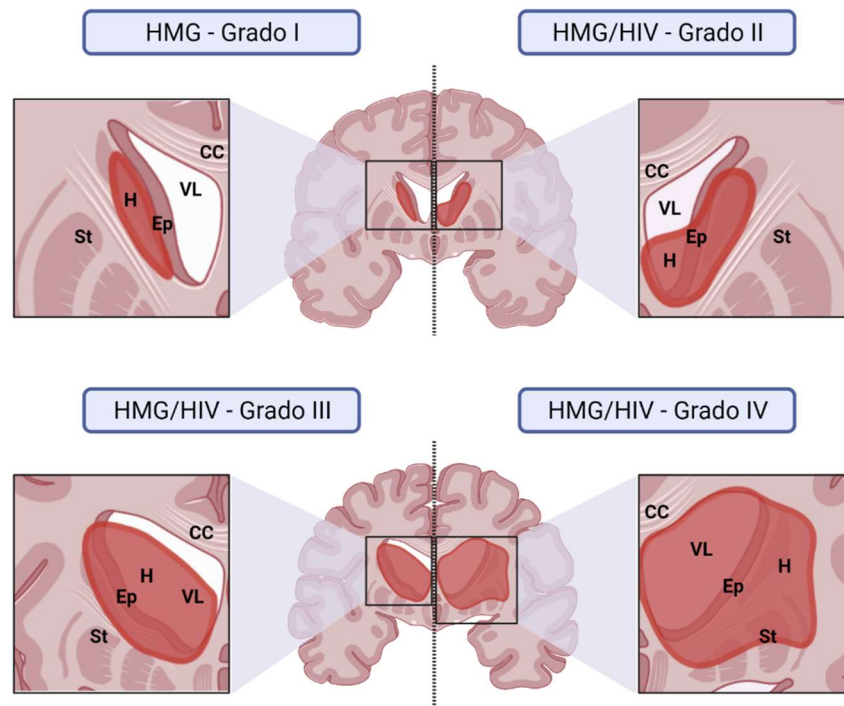


Figura 6. Clasificación de las hemorragias de la matriz germinal y hemorragias intraventriculares según lo establecido por Papile y colaboradores (1978). La extensión de la hemorragia se representa como un sombreado en rojo. **Superior izquierda:** HMG – Grado I, la hemorragia está limitada en la matriz germinal. **Superior derecha:** HMG/HIV – Grado II, la hemorragia penetra en el ventrículo lateral y lo ocupa en una extensión menor al 50 %. No hay dilatación del ventrículo lateral. **Inferior izquierda:** HMG/HIV – Grado III, la hemorragia ocupa más del 50 % del ventrículo lateral y hay dilatación ventricular. **Inferior derecha:** HMG/HIV – Grado IV, la hemorragia invade el parénquima nervioso adyacente. Abreviaturas: CC (cuerpo calloso), Ep (epéndimo), H (hemorragia), HIV (hemorragia intraventricular), HMG (hemorragia de la matriz germinal), VL (ventrículo lateral), St (estriado). Figura de elaboración propia. Creado con BioRender.com.

La hidrocefalia posthemorrágica (HPH) se da en un porcentaje de neonatos prematuros que sufren HMG/HIV, alcanzando el 75 % de los pacientes en casos severos (Ballabh, 2010). La HPH se desarrolla por varios factores que se derivan de

la hemorragia, como la presencia de factores y células inflamatorias (Holste *et al.*, 2022) y de productos de degradación de la sangre (Dawes, 2022; Toft-Bertelsen *et al.*, 2022), donde ambos afectan la función y supervivencia del epéndimo en desarrollo y maduro, hecho que favorece la aparición de la HPH. Se ha visto que el epéndimo sufre de la propia HPH (Sevensky *et al.*, 2021), lo que sitúa su pérdida en el centro del proceso patológico como causa y consecuencia de la HPH (McAllister *et al.*, 2017; Tsitouras y Sgouros, 2011). Además, la HPH se genera porque se acumula LCR debido a la obstrucción a su flujo (Karimy *et al.*, 2020) y por su hipersecreción (Karimy *et al.*, 2017; Lolansen *et al.*, 2022; Toft-Bertelsen *et al.*, 2022).

Una de las principales consecuencias de la HMG/HIV es el daño en el epéndimo, donde la sangre juega un papel central. Los eritrocitos, principal componente celular de la sangre, poseen grandes cantidades de peroxiredoxina 2, hemoglobina e iones hierro, que, junto con el ácido lisofosfatídico del suero, están involucrados en procesos de daño y disfunción sobre el epéndimo (Bramall *et al.*, 2022; Lummis *et al.*, 2019). Paralelamente, se ha observado una respuesta inflamatoria asociada a HMG/HIV (Fam *et al.*, 2017; Hallevi *et al.*, 2012). La hemorragia estimula el reclutamiento de células inmunes y la producción de citoquinas inflamatorias (Fang *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 1998; Kwon *et al.*, 2015; Tsan y Gao, 2004). Una de las citoquinas proinflamatorias más relevantes en este proceso es el factor de necrosis tumoral α (TNF α), producida por el propio epéndimo en respuesta a daño (Gong *et al.*, 1998; Ziai *et al.*, 2021). Debido a las funciones ependimarias antes descritas, el daño del epéndimo como consecuencia de la hemorragia generará alteraciones en la homeostasis del sistema nervioso central, en la regulación de la neurogénesis, obstrucciones en las vías ventriculares y, consecuentemente, HPH (Kahle *et al.*, 2016).

El tratamiento de la hidrocefalia posthemorrágica.

Actualmente, los tratamientos para la HPH son exclusivamente de índole farmacológica o quirúrgica (Cohen y Flibotte, 2022). De acuerdo con la bibliografía especializada, ninguno de los tratamientos farmacológicos está recomendado para el control de la progresión de la HPH. Algunos de ellos son de carácter profiláctico,

aunque su efectividad tampoco ha sido demostrada (Cohen y Flibotte, 2022; Mazzola *et al.*, 2014; Valdez Sandoval *et al.*, 2019).

La derivación ventriculoperitoneal, usada también en el tratamiento de otros tipos de hidrocefalia, es la opción de elección en muchos casos para tratar la HPH, aunque suele fracasar por obstrucciones debidas a una alta concentración de proteínas y sangre en el LCR. Otros mecanismos empleados en el drenaje de LCR y sangre de los ventrículos son las punciones lumbares y ventriculares, el cateterismo del ventrículo asociado a un sistema de drenaje, los drenajes ventriculogaleales, y la implantación de reservorios de LCR conectados al ventrículo para su vaciado periódico. Todas estas medidas terapéuticas son efectivas a la hora de retirar el exceso de líquido y sangre del ventrículo, aunque vienen aparejadas con cierta frecuencia a infecciones a nivel de LCR y meninges (Mazzola *et al.*, 2014; Valdez Sandoval *et al.*, 2019).

Otras terapias postuladas involucran el lavado de la cavidad ventricular para retirar la sangre, coágulos y demás componentes dañinos (citoquinas proinflamatorias, iones del hierro, radicales libres, etc.), como son la terapia DRIFT (drenaje, irrigación y terapia fibrinolítica) y el lavado endoscópico ventricular. Sin embargo, los ensayos con la terapia DRIFT en la HPH se han cancelado debido a la aparición de hemorragias secundarias, mientras que en el caso del lavado endoscópico ventricular no hay suficiente evidencia para recomendar su uso (Mazzola *et al.*, 2014; Valdez Sandoval *et al.*, 2019).

Como conclusión, ninguna de las terapias presentadas aborda el problema del daño sobre el epéndimo ni su recuperación o restablecimiento, por lo que la búsqueda de terapias en este sentido requiere de mayor investigación.

Las células madre: concepto y aplicaciones en el tratamiento de la hidrocefalia posthemorrágica.

Las células madre son células indiferenciadas con capacidad de autorrenovación que pueden dar lugar a distintos tipos celulares. Se clasifican en función de su capacidad de dar lugar un mayor o menor número de tipos celulares, si pertenecen a la misma capa embrionaria o no, así como si pueden dar lugar a un

organismo completo. Este concepto se refiere comúnmente como “potencialidad” (Zakrzewski *et al.*, 2019).

Las células madre totipotentes son aquellas que pueden dar lugar a un organismo completo *per se*, como el cigoto (Zakrzewski *et al.*, 2019). Las células madre pluripotentes no son capaces de dar lugar a un organismo completo, pero sí a células de las tres capas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo. Se incluyen en esta categoría a las células de la masa interna del blastocisto embrionario y a las células madre pluripotentes inducidas, que se obtienen por reprogramación de células somáticas diferenciadas mediante factores exógenos (Takahashi y Yamanaka, 2006). Las células madre multipotentes por su parte, quedan restringidas a generar células dentro de una sola capa embrionaria, como las células madre mesenquimales (CMM) (Ding *et al.*, 2011). Por último, las células madre unipotentes solo pueden dar lugar a un tipo celular (Zakrzewski *et al.*, 2019).

En concreto, las CMM han demostrado ser un gran candidato para el tratamiento de enfermedades donde existe inflamación o neurodegeneración, como en las enfermedades de Alzheimer, Parkinson o Huntington (Lo Furno *et al.*, 2018). Se ha demostrado que las CMM son capaces de ser reclutadas a aquellos tejidos que presentan daño gracias a su gran capacidad quimiotáctica, además de ejercer una acción moduladora sobre la respuesta inmune y la inflamación (Volarevic *et al.*, 2017; Volkman y Offen, 2017). Todo ello junto con su baja inmunogenicidad y fácil obtención y expansión (Liu *et al.*, 2009; Macrin *et al.*, 2017) mediante técnicas de cultivos celulares, hace que sean una gran herramienta para el tratamiento de afecciones como la hidrocefalia. En este ámbito se ha mostrado que las CMM, en concreto de la médula ósea, permiten la recuperación del tejido nervioso afectado en un modelo murino de hidrocefalia congénita (García-Bonilla *et al.*, 2020, 2023). Por ello, estas CMM en particular han sido seleccionadas para probar en el caso de la HPH.

OBJETIVOS

1. Determinar el efecto del ambiente hemorrágico en la diferenciación del epéndimo a partir de progenitores endimarios.
2. Determinar el efecto de un ambiente de cotrasplante con células madre mesenquimales sobre la diferenciación de los progenitores endimarios afectados por condiciones hemorrágicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación

El diseño de los experimentos, la estabulación, manipulación, cuidado de los animales, así como los diferentes procedimientos experimentales se llevaron a cabo siguiendo la legislación vigente y con la aprobación del Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Málaga (CEUMA) y la Junta de Andalucía. La manipulación de animales se realizó por personal del grupo de investigación con autorización apropiada. No se hizo separación por sexo en los animales a nivel experimental.

Los animales empleados en la realización de este trabajo fueron ratones de la cepa C57/BL-6J (Charles River Laboratory, Wilmington, Massachusetts, Estados Unidos). Los animales fueron criados y cuidados en el Centro de Experimentación y Conducta Animal (CECA) de la Universidad de Málaga a 22 °C con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con comida y agua disponible *ad libitum*.

Obtención de PEp para trasplante

Los progenitores endimarios (PEp) se obtuvieron a partir de la disección de la pared ventricular que recubre el estriado de ratones C57/BL-6J recién nacidos según lo descrito por Mirzadeh y colaboradores (2010) en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, D6546, Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) frío.

Posteriormente se disgregó el tejido mecánicamente en un medio adecuado de proliferación de PEp (ver Anexo B.1.2), y se sembraron las células a una densidad de 500 000 células/mL sobre cubreobjetos tratados con poli-D-lisina (ver Anexo B.2.2). Cada pocillo contuvo 2 mL de medio de proliferación de PEp, y se mantuvieron en una estufa de cultivos celulares HeraCell 150i (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) durante 12 horas a 37 °C, 100 % de humedad relativa y 5 % de CO₂. Después, se cambió completamente el medio de proliferación por un medio específico de diferenciación de PEp (ver Anexo B.1.3), el cual contenía tan solo un 2 % de suero fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*), permitiendo que sólo los PEp quedasen adheridos al cubreobjetos (Paez-Gonzalez *et al.*, 2014). Las células no adheridas, como los astrocitos, se retiraron al reemplazar el medio de cultivo.

Para poder analizar la presencia y ubicación de los PEp una vez trasplantados, las células se tiñeron con un marcador celular fluorescente verde (C2925, ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se diluyó el marcador a una concentración 25 µM en medio de diferenciación de PEp sin FBS. Tras calentarlo a 37 °C se aplicó a las células durante 30 minutos a 37 °C. Por último, se retiró el preparado fluorescente y se repuso el medio de diferenciación de PEp.

Para poder trasplantar los PEp era necesario despegarlos del cubreobjetos. Para ello se aplicó 0,3 mL de tripsina (0,5 g/L)-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, 0,2 g/L) (T3924, Sigma-Aldrich) durante 3 minutos a temperatura ambiente. Pasados los 3 minutos, la tripsina se bloqueó con 1 mL de medio de cultivo que contenía para ello FBS al 10 %. Se tomó una alícuota de la suspensión celular resultante para contar las células viables, mezclándola con el mismo volumen de azul tripano al 0,4 % en NaCl al 0,81 % y KH₂PO₄ al 0,06 % (T8154, Sigma-Aldrich). El resto de la suspensión celular se centrifugó a 600 g durante 2 minutos en una centrífuga Rotofix 32 (Hettich, Tuttlingen, Alemania) con rotor basculante. El sedimento celular que se obtuvo se resuspendió con una micropipeta a la concentración adecuada para trasplantar los PEp en los experimentos diseñados.

Obtención de CMM para trasplante

Las células madre mesenquimales (CMM) se obtuvieron a partir de los fémures de ratones de 21-24 días de edad. A tal efecto, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical seguida de decapitación siguiendo las normas vigentes en materia de bienestar animal. La piel de los animales se desinfectó convenientemente con etanol 70°, así como todo el material de disección a usar. Bajo la llama de un mechero de alcohol se retiró la piel y el músculo de la pierna. Tras raspar el fémur con una hoja de bisturí a fin de retirar la mayor cantidad posible de células satélite del músculo, los fémures se sumergieron en etanol 70° durante 30 segundos para desinfectarlos, y posteriormente trasladarlos a un tubo estéril con medio completo específico de CMM (ver Anexo B.1.4) sin FBS y con el triple de volumen de penicilina-estreptomicina (3 % v/v; P0781, Sigma-Aldrich). El medio de CMM había sido enfriado previamente en un baño de hielo.

A continuación, en condiciones de esterilidad, en una cabina de flujo laminar para cultivos celulares Telstar AV-30/70 (Telstar, Azbil, Tokio, Japón), se cortaron las epífisis de los fémures y se insufló el medio completo de CMM a través de la diáfisis. Esto se llevó a cabo mediante una jeringuilla desechable de calibre 25G para expeler la médula ósea, siempre de dos fémures del mismo ratón en una misma placa de Petri estéril. Seguidamente, se centrifugó el contenido de la placa de Petri a 400 g durante 5 minutos en una centrífuga RotoFix 32 con rotor basculante. De este modo, se pudo retirar el sobrenadante de las células, que quedaron en el sedimento. Seguidamente se resuspendió el sedimento celular en medio completo de CMM con una micropipeta y se llevó a un volumen final de 12 mL. La suspensión celular resultante de cada ratón se sembró en un frasco horizontal de cultivos de 75 cm² de superficie (FT75, 130190, ThermoFischer).

Para eliminar células como los eritrocitos, al cuarto día tras la siembra se hizo un lavado con 10 mL de tampón fosfato salino (PBS, *phosphate buffer saline*; ver Anexo A.1.2). Esto permitía que células no deseadas se eliminasen. Por el contrario, las CMM permanecen gracias a su capacidad de adherencia al plástico (Li *et al.*, 2016). A partir de entonces se renovó el medio cada 3 días hasta alcanzar aproximadamente el 70-80 % de confluencia (semiconfluencia).

Una vez alcanzada la semiconfluencia, las CMM se subcultivaron. A tal efecto se realizaron dos lavados con 10 mL de PBS estéril y se añadió 3 mL de tripsina-EDTA. Se dejó actuar a la tripsina a 37 °C durante 5 minutos y posteriormente se raspó la superficie del frasco con un rascador de células (CSCP-025-100, Labbox, España) para despegarlas en su totalidad. Se bloqueó la acción proteolítica de la tripsina añadiendo 6 mL de medio completo de CMM, ya que contiene FBS, y se centrifugó la suspensión celular a 400 g durante 5 minutos. Finalmente, se aspiró el sobrenadante, se resuspendió el sedimento celular con una micropipeta, se llevó la suspensión celular a un volumen final de 24 mL, y se repartió dicho volumen entre dos frascos horizontales de cultivos de 75 cm² de superficie. Se renovó el medio de cultivo cada 3 días.

Para poder trasplantar las CMM, se lavaron dos veces con 10 mL de PBS y se despegaron con tripsina de la forma descrita anteriormente. Para contar las células se tomó una alícuota de la suspensión celular y se mezcló con el mismo volumen de azul tripano de la forma descrita. Para la resuspensión celular, se completó con el volumen apropiado de forma que quedaran a la concentración de uso programada para los experimentos de trasplante.

Las células obtenidas con el procedimiento descrito han sido previamente probadas como CMM, mediante su caracterización donde se han mostrado positivas para los marcadores CD44, CD73 y CD90, negativas para CD34 y CD45, así como por presentar, en condiciones *in vitro*, capacidad de diferenciación en adipocitos, condrocitos y osteocitos (García-Bonilla *et al.*, 2020).

Experimento de diferenciación de PEp en condiciones hemorrágicas y con trasplante de CMM

Los PEp se obtuvieron tal y como se ha descrito en el apartado *Obtención de PEp para trasplante*. En este caso, los PEp se sembraron sobre placas estériles de 6 pocillos con 5 cubreobjetos tratados con poli-D-lisina (ver Anexo B.2.2) por cada uno de sus pocillos. A continuación, se reemplazó el medio por medio específico de diferenciación de PEp (ver Anexo B.1.3), renovándolo parcialmente cada 48 horas. El cultivo se mantuvo en estas condiciones hasta un máximo de 9 días. De igual modo, la reducida cantidad de FBS del medio impide la adhesión de células que no sean PEp

(Paez-Gonzalez *et al.*, 2014), retirándolas con cada renovación parcial del medio. A las 24 horas de aplicar el medio de diferenciación de PEp, se aplicaron uno de los siguientes tratamientos a cada pocillo:

- (i) *Control*: sin tratamiento.
- (ii) *Sangre*: 50 μ L de sangre una vez añadido una vez.
- (iii) *Suero sanguíneo*: 50 μ L de suero sanguíneo añadido una vez.
- (iv) *TNF α* : 50 ng/mL de factor de necrosis tumoral α (TNF α) añadido diariamente hasta un máximo de 9 días.
- (v) *CMM*: 20 000 CMM/mL en 50 μ L añadido una vez.
- (vi) *Sangre + CMM*: 50 μ L de sangre y 20 000 CMM/mL en 50 μ L añadidos una vez.
- (vii) *Suero sanguíneo + CMM*: 50 μ L de suero sanguíneo y 20 000 CMM/mL en 50 μ L añadidos una vez.
- (viii) *TNF α + CMM*: 20 000 CMM/mL añadido una vez y 50 ng/mL de factor de necrosis tumoral α (TNF α) añadido diariamente hasta un máximo de 9 días.

La sangre se obtuvo mediante la decapitación de los ratones recién nacidos. El suero sanguíneo se obtuvo tras dejar coagular la sangre, centrifugar a 1 400 g durante 10 minutos a 4 °C, y recolectar el sobrenadante.

Para analizar el efecto sobre la diferenciación de los PEp en cada una de las condiciones experimentales a lo largo del tiempo, se extrajeron cubreobjetos a los 3, 6 y 9 días desde el cambio a medio de diferenciación de PEp mencionado anteriormente. Los cubreobjetos se fijaron en paraformaldehído al 4 % m/v en PB 0,1 M pH 7,3 por 30 minutos a 4 °C. Después se realizó una tinción por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo primario no conjugado dirigido contra β IV-tubulina (marcador de cilios y por tanto del epéndimo diferenciado) durante 48 horas a 4 °C a dilución 1:400. Se utilizaron anticuerpos secundarios adecuados conjugados con fluorocromos. Se emplearon en incubaciones de 1 hora a temperatura ambiente y diluidos 1:1000. El control negativo de la tinción consistió en realizar todo el proceso, pero sin aplicar el anticuerpo primario. También se llevó a cabo una tinción nuclear fluorescente con DAPI (Figura 7). Los detalles de los anticuerpos y protocolos pueden consultarse en el Anexo C.

Para las condiciones (i), (ii), (iii) y (iv), con 5 cubreobjetos en cada pocillo, se realizaron 5 réplicas ($n = 5$). Para las condiciones (v), (vi), (vii) y (viii), con 5 cubreobjetos en cada pocillo, se realizaron 7 réplicas ($n = 7$).

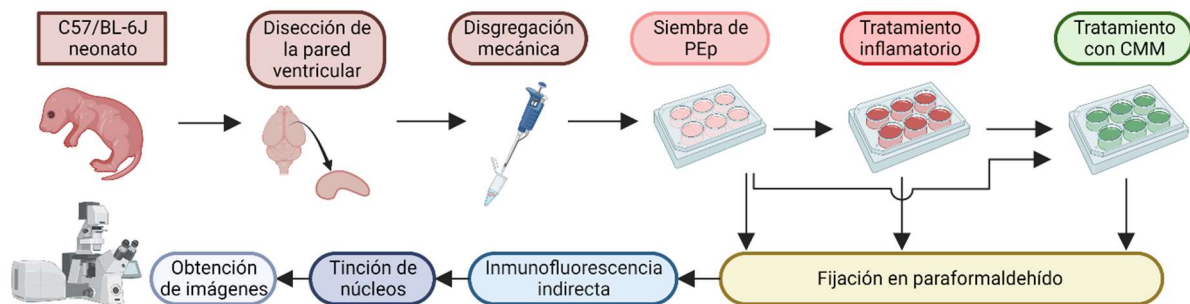


Figura 7. Representación de la metodología empleada en los ensayos sobre cultivos de progenitores endimarios (PEp). El proceso comienza sacrificando a ratones neonatos de cuatro días de edad, de los que se disecciona la pared de los ventrículos laterales para generar una suspensión celular por disgregación mecánica. La suspensión celular se siembra sobre placas multipocillo con cubreobjetos tratados con poli-D-lisina. Algunos no recibieron ningún tratamiento adicional, otros solo tratamiento de condiciones hemorrágicas (sangre, suero sanguíneo o $TNF\alpha$) o solo tratamiento con células madre mesenquimales (CMM); y otros recibieron ambos tratamientos. Los cubreobjetos se fijaron, se les realizó una tinción por inmunofluorescencia indirecta y una tinción nuclear. Las imágenes de los preparados se tomaron por microscopía láser confocal. Figura de elaboración propia. Creado con BioRender.com.

Inducción de la HMG/HIV y la HPH

Se realizó en ratones de 4 días de edad, sin tener en cuenta su sexo, bajo anestesia con 2 % de isoflurano en 0,5 L/min de O_2 . Se les inyectó 1 μL de NaCl al 0,9 % con 0,05 U/ μL de colagenasa I (C2674, Sigma-Aldrich) en la matriz germinal adyacente al ventrículo lateral de cada hemisferio cerebral, con el objeto de producir la HMG/HIV y la HPH. La inyección se realizó con una jeringa con aguja del calibre 33G Hamilton Neuros (HAMI65460-03, Hamilton, Reno, Nevada, Estados Unidos) sin el uso de estereotáxico. Las coordenadas empleadas para la inyección fueron ensayadas previamente con inyecciones de azul tripano y fueron 0,5 mm posterior al

globo ocular, 1 mm superior al globo ocular y 2 mm de profundidad; todo ello con un ángulo de 45° respecto de la horizontal (Figura 8).

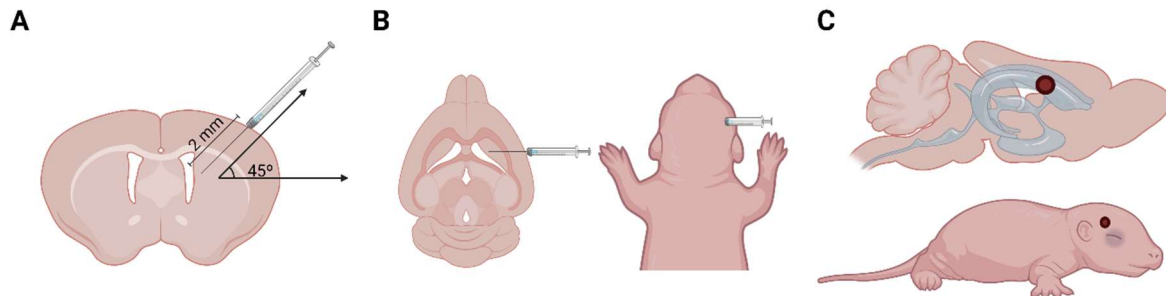


Figura 8. Representación de las coordenadas de inyección en la matriz germinal en ratones de 4 días de edad. (A) Vista en corte coronal del ángulo y profundidad de inyección. **(B)** Vista dorsal y en corte horizontal del sitio de inyección. **(C)** Vista lateral derecha del punto de inyección, representado por un punto rojo. Se muestran en gris los ventrículos. Figura de elaboración propia. Creado con BioRender.com.

Cultivos organotípicos de explantes de pared ventricular

Los animales se sacrificaron mediante decapitación 48 horas después de inducir la HMG/HIV. Los cerebros se diseccionaron y se clasificaron bajo lupa en función de la extensión de la hemorragia y el tamaño ventricular en dos categorías: HMG/HPH severa y HMG/HPH moderada (Figura 9). Se determinó como cerebros con HMG/HPH severa aquellos que presentaran hemorragia intraventricular e hidrocefalia incipiente.

La pared ventricular que recubre el estriado se extrajo en DMEM frío siguiendo el método descrito por Mirzadeh y colaboradores (2010). Los explantes se depositaron en insertos de cultivos celulares Millicell (PICM0RG50, Sigma-Aldrich) en placas de seis pocillos. Cada pocillo contuvo 1mL de medio de cultivo para explantes (ver Anexo B.1.1) esterilizado por filtración a través de membrana de 0,2 μm de tamaño de poro (FB12566510, ThermoFisher).

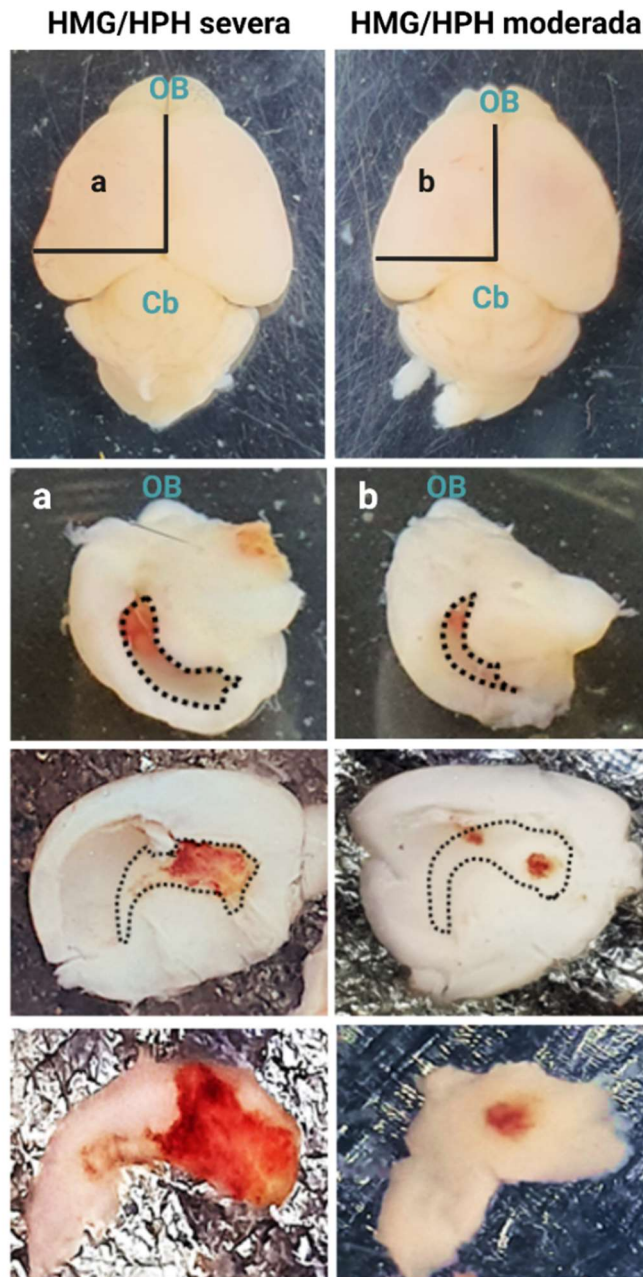


Figura 9. Comparativa visual entre cerebros con hemorragia de la matriz germinal (HMG) / hidrocefalia posthemorrágica (HPH) severa y moderada. Se muestran en la columna izquierda imágenes correspondientes a HMG/HPH severa, mientras que la columna derecha recoge imágenes correspondientes a HMG/HPH moderada. Los cerebros de una y otra categoría son indistinguibles mediante un examen externo. Al realizar cortes según lo marcado por la línea continua se obtienen las imágenes de la segunda fila, rotuladas con “a” y “b”, donde se puede apreciar el ventrículo lateral (demarcado por una línea discontinua) en vista caudal. Los cerebros con HMG/HPH severa manifiestan un mayor volumen ventricular. Al retirar la pared medial de los ventrículos laterales se obtienen las imágenes de la tercera fila, donde se aprecia una hemorragia extensa y notable en el cerebro con HMG/HPH severa, mientras que en la HMG/HPH moderada la hemorragia está más limitada. Se muestra la pared lateral del ventrículo lateral rodeada de una línea punteada. Las imágenes inferiores muestran un detalle de los explantes una vez diseccionados. Abreviaturas: OB (bulbo olfatorio), Cb (cerebelo). Figura de elaboración propia. Creado con BioRender.com

Los explantes se incubaron a 37 °C, 100 % de humedad relativa y en atmósfera de CO₂ al 5 % durante un máximo de 7 días. El medio de cultivo se reemplazó parcialmente cada 48 horas, y se trasplantaron distintos tipos celulares conforme a lo descrito en el apartado a continuación. Estos explantes de tejido proveen unas condiciones *ex vivo* de HMG/HIV y HPH que pueden ser estudiadas fuera del animal.

Trasplante de PEp y CMM en explantes de pared ventricular. Análisis de la diferenciación de los PEp

Para estudiar el potencial terapéutico de los PEp y las CMM sobre explantes procedentes de animales en los que se había inducido HMG/HIV y HPH mediante inyecciones de colagenasa I, se determinaron las siguientes condiciones experimentales, donde *sev* = severa, y *mod* = moderada:

- (i) *HMG/HPH_{sev} + PEp*
- (ii) *HMG/HPH_{sev} + CMM + PEp*
- (iii) *HMG/HPH_{mod} + PEp*
- (iv) *HMG/HPH_{mod} + CMM + PEp*

Una vez obtenidas las CMM y los PEp, se resuspendieron separadamente a 10 000 células/μL y se aplicó 1 μL de cada suspensión celular a cada explante mediante una jeringa Hamilton de calibre 26G (75N, Hamilton). El reducido volumen empleado busca alterar lo mínimo posible la superficie y estructura del explante. La adición de las CMM tuvo lugar 6 horas tras la generación del explante. La adición de los PEp se llevó a cabo 12 horas más tarde, es decir, 18 horas desde la generación del explante.

Con el objetivo de evaluar la diferenciación de los PEp trasplantados, se realizó una fijación en paraformaldehído al 4 % durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente se llevó a cabo una tinción mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos primarios no conjugados dirigidos contra Foxj1 a dilución 1:150 (factor de transcripción, marcador de células del linaje endimario) y contra βIV-tubulina a dilución 1:400 (marcador de cilios y por tanto del epéndimo diferenciado) durante 72 horas a 4 °C. Se emplearon anticuerpos secundarios apropiados conjugados con fluorocromos, incubándose a dilución 1:1000 durante 1 hora a temperatura ambiente.

También se empleó una tinción de núcleos mediante DAPI. No se aplicaron anticuerpos primarios en el control negativo de la tinción (Figura 10). Los detalles de los anticuerpos y protocolos pueden consultarse en el Anexo C.

Para cada condición experimental se emplearon 3 explantes procedentes del mismo pocillo y se replicó 5 veces ($n = 5$).

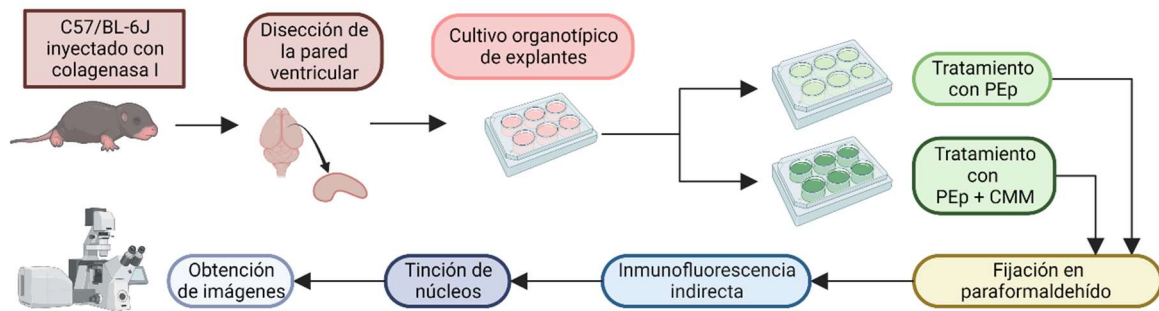


Figura 10. Representación de la metodología empleada en los ensayos sobre explantes de pared ventricular. El proceso comienza sacrificando a ratones en los que se indujo hemorragia en la matriz germinal (HMG) mediante inyección de colagenasa I. Se extraen los cerebros y se disecciona la pared lateral del ventrículo lateral. Los explantes de pared ventricular se depositan sobre insertos en placas multipocillo. Los explantes recibieron o bien un tratamiento solo con progenitores endimarios (PEp), o bien un tratamiento combinado de PEp y células madre mesenquimales (CMM). Los explantes se fijaron y se les realizó una tinción por inmunofluorescencia indirecta y una tinción nuclear. Las imágenes de los preparados histológicos se tomaron por microscopía láser confocal. Figura de elaboración propia. Creado con BioRender.com.

Toma y análisis de imágenes

Las imágenes se adquirieron en el Área de Microscopía de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga en un microscopio láser confocal Leica SP8 (Leica, Wetzlar, Alemania).

Para cada experimento se obtuvieron las imágenes simultáneamente, tanto de los controles como grupos experimentales bajo la misma configuración del aparato. Las imágenes se tomaron usando un objetivo seco de 20 aumentos. Se aplicó el método doble ciego, sin conocer las condiciones experimentales tanto en la toma de las imágenes como en su cuantificación.

Análisis estadísticos

Los datos se analizaron y representaron empleando el software GraphPad 9.2.0 (GraphPad Software, Estados Unidos) y Microsoft Excel 16.71.

Para las imágenes relativas al apartado *Experimento de diferenciación de PEp en condiciones hemorrágicas y con trasplante de CMM*, se calculó la media de los 5 cubreobjetos de cada una de las 5 o 7 réplicas (según experimento) y se calculó la desviación típica a partir de los valores medios de cada réplica.

En lo referente a las imágenes del apartado *Trasplante de PEp y CMM en explantes de pared ventricular. Análisis de la diferenciación de los PEp*, se calculó la media de los 3 explantes de cada una de las 5 réplicas y se calculó la desviación típica a partir de los valores medios de cada réplica.

Para conocer si existían condiciones de distribución normal, se realizaron las pruebas de Shapiro-Wilk o de D'Agostino-Pearson, según fuera necesario por las condiciones de curtosis y asimetría en la distribución. Debido a que en todos los experimentos la distribución no presentaba normalidad, se llevó a cabo un análisis no paramétrico, determinando la significancia de las diferencias entre los datos mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. Se consideraron significativas las diferencias si el p-valor era menor que 0,05.

RESULTADOS

Maduración de los PEp en condiciones de HMG/HPH *in vitro*

Inicialmente, para conocer en qué medida se podía ver afectada la diferenciación endimaria por las condiciones a las que se someten sus células progenitoras durante la HPH, se realizaron experimentos en cultivos primarios de PEp.

Las condiciones experimentales estudiadas fueron: sangre, para estudiar el efecto de las células sanguíneas; suero sanguíneo, para estudiar el efecto de los demás componentes de la sangre sin las células sanguíneas; y TNF α , para estudiar el papel de uno de los factores inflamatorios clave presentes en una hemorragia; además de situación control, sin tratamiento, para poder tener una referencia sin condiciones hemorrágicas y poder generar cuantificaciones relativas.

En estos cultivos, se observó que en las tres condiciones experimentales estudiadas (sangre, suero sanguíneo y TNF α), la ciliogénesis queda afectada negativamente. Existen menos células con cilios, detectados mediante inmunofluorescencia para la proteína β IV-tubulina, en las células del linaje endimario procedentes de los PEp cultivados. La identificación de los cilios implica que la maduración de la célula endimaria está completa (Figura 11).

En conclusión, de modo general, en condiciones equivalentes a las hemorrágicas se pudo detectar menor cantidad de células endimarias diferenciadas.

Asimismo, de modo comparado, la diferenciación de los PEp estaba significativamente más perjudicada en presencia de sangre completa que en la de suero sanguíneo a los 6 y 9 días (Figura 11).

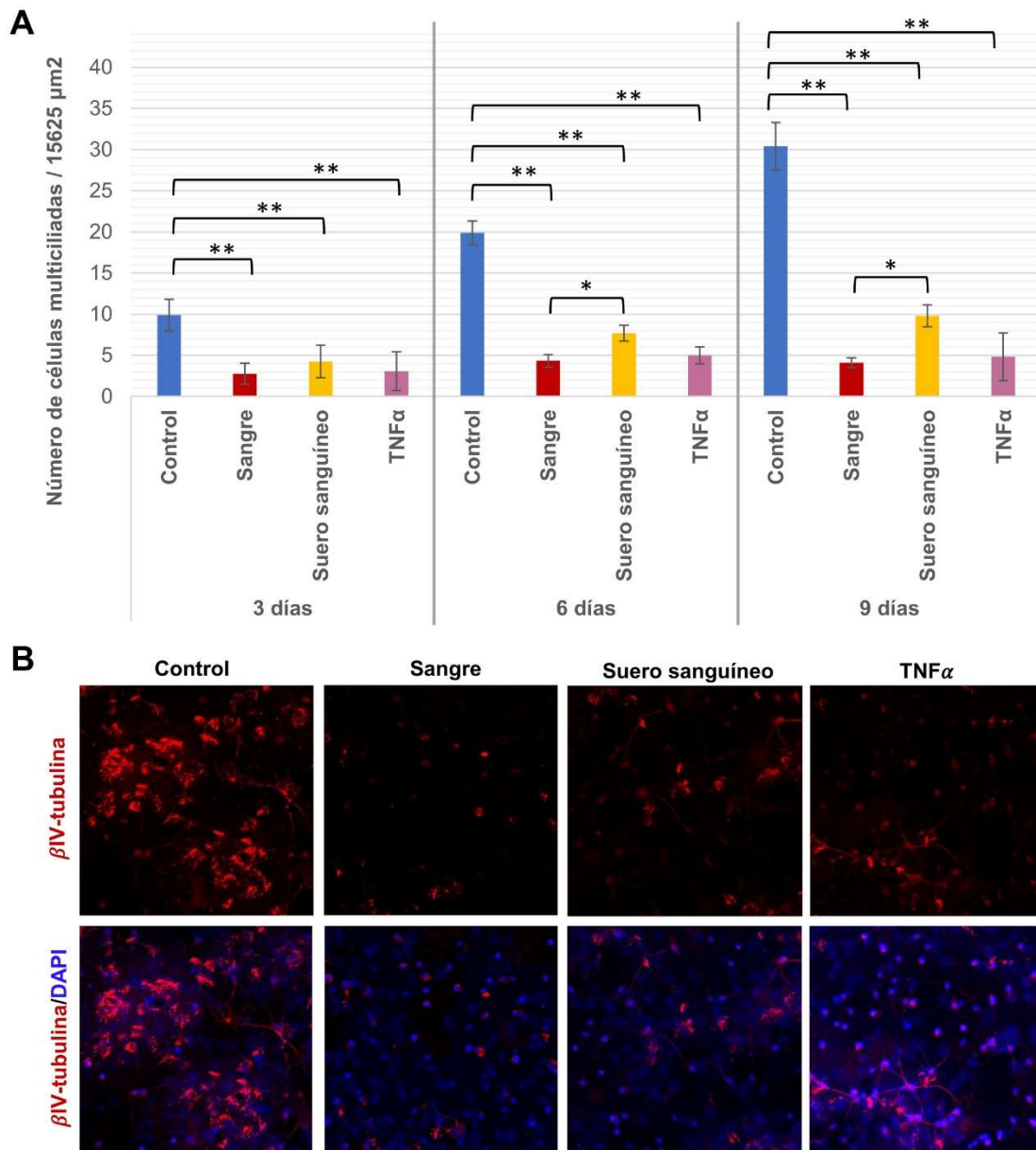


Figura 11. Efecto de la sangre, el suero sanguíneo y el TNF α sobre la diferenciación de los progenitores endimarios (PEp) a varios tiempos en condiciones *in vitro*. (A) Se representa el número de PEp que desarrollan cilios por campo de micrografía (15625 μm^2) en cultivo primario a los 3, 6 y 9 días de ser expuestas a sangre, suero sanguíneo y TNF α . Estas condiciones emulan las condiciones a las que se exponen los PEp durante las hemorragias de la matriz germinal y hemorragias intraventriculares, así como en la hidrocefalia posthemorrágica. En la condición control no se aplicó condicionamiento. Se muestra la media junto con la desviación estándar, representada mediante las barras, obtenidas a partir de $n = 5$ para cada condición y tiempo. Se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. ** $0,005 \leq p < 0,01$; * $0,01 \leq p < 0,05$. (B) Imágenes representativas empleadas para la cuantificación de los datos mostrados en (A) correspondientes a los 9 días *in vitro*. Se muestra con fluorescencia en rojo el marcaje de cilios con $\beta\text{IV-tubulina}$ y en azul el marcaje de los núcleos con DAPI.

Efecto de las CMM en la maduración del epéndimo *in vitro*

A fin de caracterizar el efecto sobre la diferenciación de los PEp de un ambiente condicionado por CMM, se realizaron cultivos primarios de PEp con o sin adición de CMM. De igual modo que en el apartado anterior, la identificación de las células endimarias maduras se llevó a cabo mediante inmunomarcaje de la proteína β IV-tubulina, que marca sus cilios. La cuantificación de las células ciliadas en las distintas condiciones permitió observar como a los 6 días del inicio del cultivo, la cantidad de células ciliadas, y por tanto diferenciadas, era significativamente mayor en presencia de CMM, alrededor del 35 % más que el control (Figura 12). En cambio, antes y después de los 6 días, a los 3 y 9 días, el número de células ciliadas en presencia de CMM no era significativamente diferente respecto de sus condiciones controles (Figura 12).

Los resultados permitieron determinar que las CMM aceleraron la diferenciación de los PEp aunque no lograron aumentar la cantidad de células dirigidas a ser epéndimo ni el número total de células multiciliadas total final, a los 9 días (Figura 12).

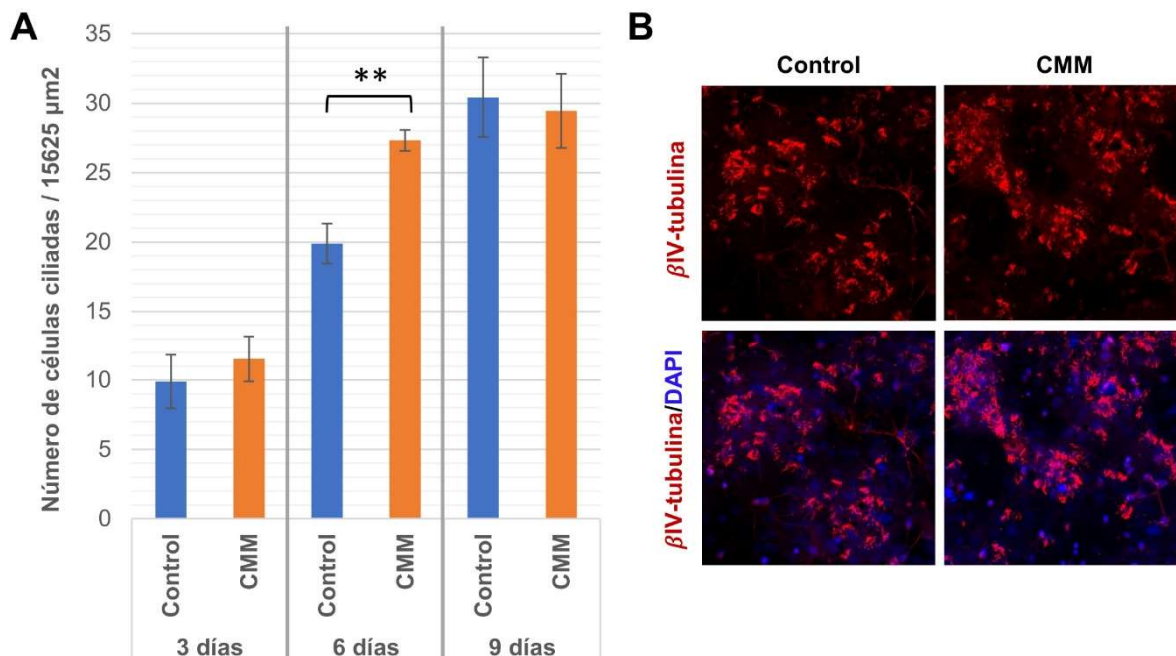


Figura 12. Efecto sobre la diferenciación de los progenitores endimarios (PEp) en condiciones de cocultivo junto con células madre mesenquimales (CMM). (A) Se representa el número de PEp que desarrollan cilios por campo de micrografía ($15625 \mu\text{m}^2$) en condiciones de

cultivo primario a los 3, 6 y 9 días de ser cocultivadas con CMM. En la condición control no se cocultivaron los PEp con CMM. Se muestra la media junto con la desviación estándar, representada mediante las barras, obtenidas a partir de $n = 5$ para cada condición y tiempo. Se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. $** 0,005 \leq p < 0,05$. **(B)** Imágenes representativas empleadas para la cuantificación de los datos mostrados en (A), correspondientes a los 9 días de cultivo *in vitro*. Se muestra con fluorescencia en rojo el marcaje de cilios con β IV-tubulina y en azul el marcaje de los núcleos con DAPI.

Efecto de las CMM en el restablecimiento de la diferenciación del epéndimo en condiciones de HMG/HPH

Una vez determinado el efecto de las condiciones hemorrágicas y la capacidad del ambiente generado por las CMM para acelerar la maduración de los PEp, se estudió si ese ambiente con CMM podría ser también capaz de restablecer la diferenciación de los PEp en condiciones de HMG/HPH.

Para ello se estudiaron las mismas condiciones experimentales anteriores (sangre, suero sanguíneo y $TNF\alpha$), pero en este caso cocultivando con CMM según lo descrito en el apartado *Material y métodos*. Asimismo, se emplearon dos controles: un control sin cocultivo de CMM y un control con cocultivo de CMM. Los controles cumplieron la función de control interno del efecto de las CMM y permitieron comparar los resultados entre sí relativizándolos con respecto al control.

La identificación de las células ciliadas se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia dirigida contra β IV-tubulina. La cuantificación de las células multiciliadas en las diferentes condiciones experimentales mostraron diferencias entre los distintos tratamientos.

En primer lugar, los datos de células multiciliadas de cultivos de PEp en presencia de sangre, mostraron que el ambiente generado por las CMM no fue lo suficientemente propicio para recuperar significativamente la capacidad de diferenciación a epéndimo multiciliado cuando se comparaba con las condiciones control sin sangre (Figura 13).

En segundo lugar, según los datos de células multiciliadas de cultivos de PEp en presencia de suero sanguíneo y $TNF\alpha$ en cocultivo con CMM, mejoró significativamente el porcentaje de epéndimo multiciliado generado respecto a las condiciones control sin suero sanguíneo y $TNF\alpha$ (Figura 13).

En presencia de suero sanguíneo y TNF α el porcentaje de células ciliadas aumentó en torno a un 50 % al aplicar las CMM, excepto en presencia de TNF α a los 6 días, donde ese porcentaje fue ligeramente menor (Figura 13).

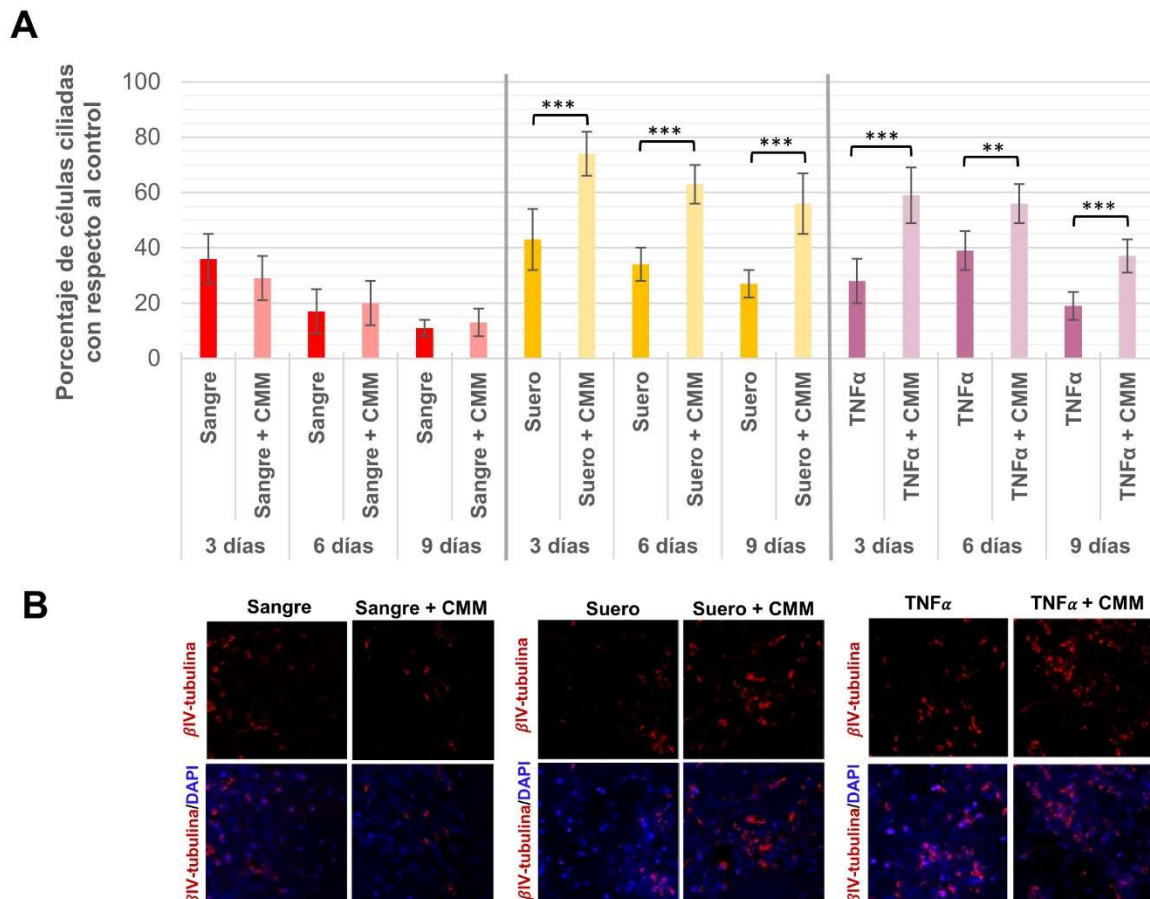


Figura 13. Efecto sobre la diferenciación de los progenitores endimarios (PEp) condicionada por sangre, suero sanguíneo y TNF α , del ambiente de cocultivo con células madre mesenquimales (CMM). (A) Porcentaje de PEp que desarrollan cilios con respecto a su condición control a los 3, 6 y 9 días bajo condicionamiento con sangre completa (sangre), suero sanguíneo (suero) y TNF α ; y con o sin cotrasplante con CMM. Se muestra la media junto con la desviación estándar, representada mediante las barras, obtenidas a partir de $n = 5$ para las condiciones sangre, suero y TNF α a los 3, 6 y 9 días, y a partir de $n = 7$ para sangre + CMM, suero + CMM y TNF α + CMM a los 3, 6 y 9 días. Se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. * $p < 0,005$; ** $0,005 \leq p < 0,01$. (B) Imágenes representativas empleadas para la cuantificación de los datos mostrados en (A), correspondientes a los 9 días. Se muestra en rojo el marcaje de cilios con β IV-tubulina y en azul el marcaje de los núcleos con DAPI.**

Generación de la HMG/HPH moderada y severa en ratones

Con el objeto de comprobar si los resultados obtenidos *in vitro* pueden ser extrapolables al desarrollo del epéndimo en tejido nervioso, se realizaron experimentos trasplantando los diferentes tipos de células madre en explantes de paredes ventriculares de ratones donde se generó HMG con colagenasa I, que por tanto serían condiciones de tratamiento *ex vivo*. Tras las inyecciones con colagenasa en ratones neonatos y diseccionar sus cerebros y paredes ventriculares, se determinó que el 55,5 % de los ratones desarrollaron HMG/HPH severa, mientras que el 30,3 % desarrollaron HMG/HPH moderada. El 14,2 % restante de los animales murieron antes de las 24 horas tras el tratamiento y por tanto no pudieron ser utilizados para los análisis. Los explantes se seleccionaron como representantes de las condiciones neuroinflamatorias diferenciales presentes en la HMG/HPH de menor o mayor gravedad. Por tanto, en ello, se podría ver cómo afecta la presencia de CMM en la diferenciación de los PEp trasplantados terapéuticamente según la gravedad de la HMG/HPH.

Efecto del trasplante de PEp y CMM en explantes de pared ventricular afectada por HMG/HPH

Con el objetivo de estudiar cómo la presencia de un ambiente creado por las CMM puede afectar la supervivencia y diferenciación de los PEp trasplantados en una pared ventricular, se realizaron explantes de pared ventricular de animales a los que se les había inducido HMG/HIV y HPH mediante inyección de colagenasa I, y se obtuvieron y cultivaron explantes *ex vivo*. Sobre estos explantes, una vez estabilizados en los insertos de cultivo trascurridas 6 horas tras su siembra, se trasplantaron CMM en la superficie ventricular. Posteriormente, tras 12 horas, se trasplantaron los PEp.

Para el estudio de la supervivencia se cuantificaron células que presentaban presencia de marcador celular fluorescente (aplicado previamente según lo descrito en el apartado *Material y métodos*), y que por tanto provenían de los PEp trasplantados; y que expresaban el factor de transcripción Foxj1. Al cuantificar la supervivencia se detectó un incremento de más del 40 % en la supervivencia de los PEp trasplantados en los explantes procedentes de cerebros con HMG/HPH moderada con respecto a la HMG/HPH severa (Figura 14). Además, en la HMG/HPH

moderada, el contratamiento con CMM potenció la supervivencia de los PEp (Figura 14).

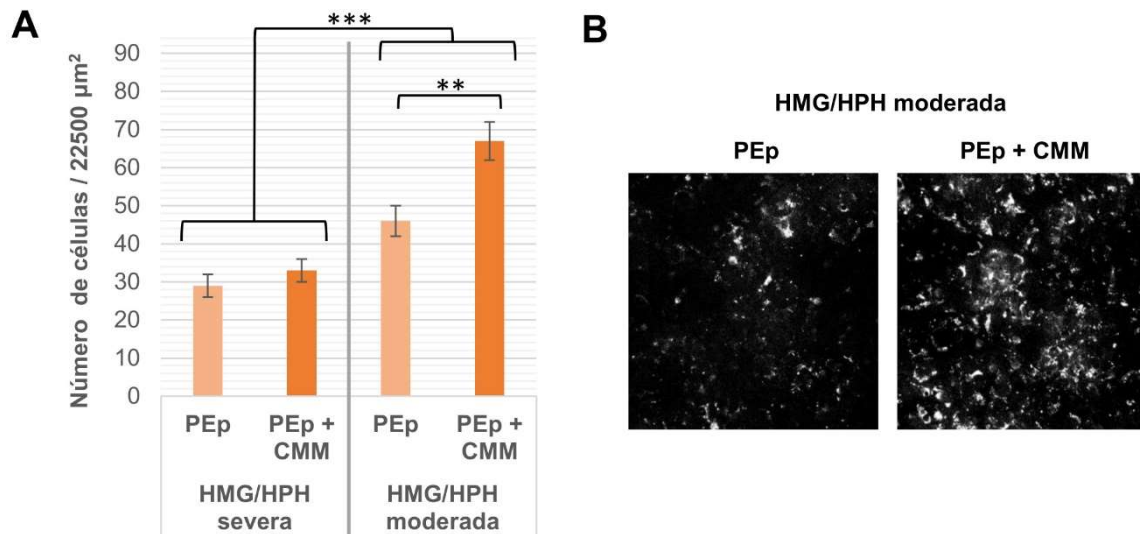


Figura 14. Efecto sobre la supervivencia celular tras el trasplante de células madre mesenquimales (CMM) y progenitores endimarios (PEp) sobre explantes de pared ventricular afectados por hemorragia en la matriz germinal (HMG)/hidrocefalia posthemorrágica (HPH). (A) Se representa el número total de PEp por campo de micrografía ($22500 \mu\text{m}^2$) que sobrevivieron a los 7 días de ser trasplantados. Se han analizado separadamente los explantes considerados de animales desarrollando HMG/HPH severa o moderada. Se muestra la media junto con la desviación estándar, representada mediante las barras, obtenidas a partir de $n = 5$ para cada condición. Se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. *** $p < 0,005$; ** $0,005 \leq p < 0,01$. (B) Imágenes representativas empleadas para la cuantificación mostrada en (A). En blanco se muestra la señal del marcador celular, que se aplicó a los PEp antes de trasplantarlos. Las imágenes corresponden a explantes con HMG/HPH moderada y fueron obtenidas a los 7 días del trasplante.

Respecto a la diferenciación en los explantes, se quiso estudiar si, tal y como se ha visto en cultivos primarios de PEp, las CMM no alteraban el destino celular de los PEp hacia células endimarias multiciliadas. Para el estudio de la diferenciación se cuantificaron células multiciliadas mediante inmunomarcaje de β IV-tubulina y que mostraban presencia de marcador celular fluorescente. Tras la obtención de los resultados, se comprobó que las CMM no cambiaban el destino celular de los PEp trasplantados respecto de los explantes tratados en exclusiva con PEp, al no haber diferencias significativas en el porcentaje de células trasplantadas Foxj1 ciliadas con o sin trasplante de CMM (Figura 15).

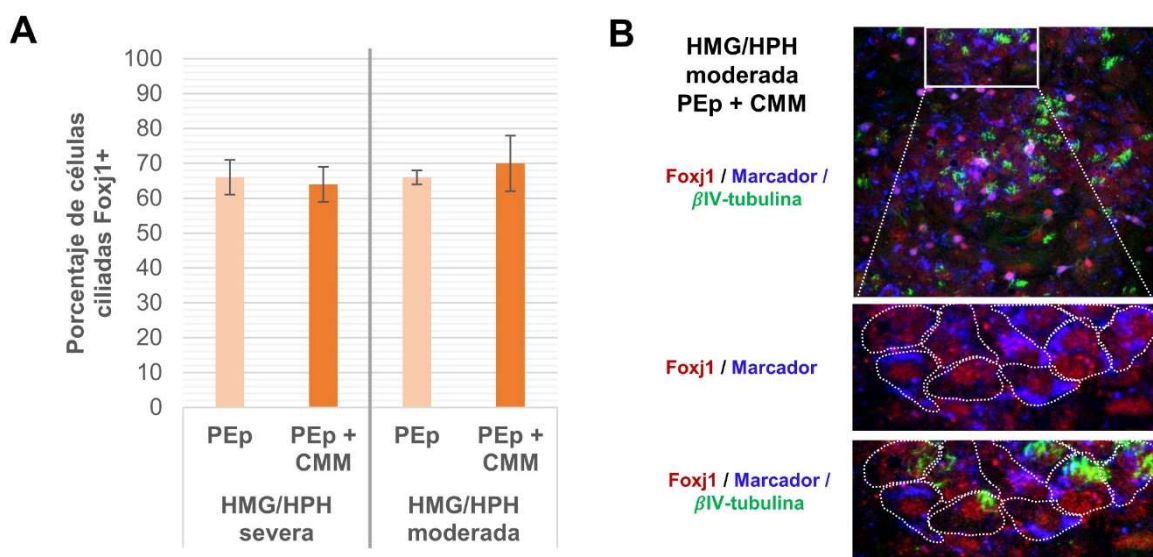


Figura 15. Efecto sobre la diferenciación endimaria del trasplante de células madre mesenquimales (CMM) y progenitores endimarios (PEp) sobre explantes de pared ventricular afectados por hidrocefalia posthemorrágica (HPH). (A) Se representa el porcentaje de células Foxj1+ procedentes de los PEp trasplantados que finalmente se diferencian en células endimarias multiciliadas a los 7 días del trasplante en ausencia y presencia de cotrasplante con CMM. Se han agrupado separadamente los explantes considerados desarrollando HMG/HPH severa o HMG/HPH moderada. Se muestra la media junto con la desviación estándar, representada mediante las barras de error, obtenidas a partir de $n = 5$ para cada condición. Se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. No se hallaron diferencias significativas. **(B)** Imagen representativa empleada para la cuantificación mostrada en (A). Con fluorescencia en rojo se muestra Foxj1, en azul el marcador celular aplicado a los PEp antes de trasplantarlos y en verde β IV-tubulina (cilios). Las imágenes corresponden a un explante con HMG/HPH moderada trasplantado con PEp y CMM, obtenida a los 7 días del trasplante.

DISCUSIÓN

Efecto de las condiciones hemorrágicas presentes en la HPH sobre la diferenciación de los PEp

A la luz de los resultados obtenidos, se ha podido demostrar que las condiciones que se presentan en la HPH, como son la presencia de sangre con todos sus componentes, suero sanguíneo aislado y la citoquina proinflamatoria TNF α

presente en la sangre, impiden la diferenciación completa de los PEP hacia epéndimo multiciliado maduro. Este hecho estaría de acuerdo con el papel que desempeña Foxj1, implicado en la formación y mantenimiento de las células endimarias.

La diferenciación del epéndimo es estrictamente dependiente de Foxj1, el cual se expresa en las células de la glía radial comprometidas a diferenciarse hacia epéndimo (y que por tanto son PEP) (Jacquet *et al.*, 2009). Además, la actividad de Foxj1 debe darse de forma constante y permanente en las células endimarias maduras para que se mantengan en su estado multiciliado (Abdi *et al.*, 2018). Foxj1 es un regulador de la ciliogénesis (Jacquet *et al.*, 2009). Sin embargo, tiene una vida media muy corta y depende de su fosforilación por la quinasa IKK2 (*Inhibitor of nuclear factor Kappa-B Kinase, subunit beta*), también referida como IKK β , para no ser degradado por el sistema ubiquitina-proteasoma y poder ejercer su función como factor de transcripción en el núcleo (Abdi *et al.*, 2018) (Figura 16).

Debe tenerse en cuenta que IKK2 es un componente del complejo IKK, que forma parte de la ruta de señalización intracelular NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), bien conocida por su importancia en la respuesta a estímulos inflamatorios (Oeckinghaus *et al.*, 2011).

Una vez expuestos los PEP a la sangre, el suero sanguíneo y el TNF α , se activa la ruta de señalización NF- κ B, haciendo que el complejo IKK desarrolle su actividad canónica, dejando así de fosforilar a Foxj1, avocándolo a su degradación por el proteasoma. La degradación de Foxj1 supone en última instancia la pérdida del estado maduro y multiciliado de las células del epéndimo (Abdi *et al.*, 2018). Se sabe además que los productos de degradación de la sangre y el TNF α activan la vía NF- κ B a través de, respectivamente, el receptor Toll-like 4 (TLR4) (Lan *et al.*, 2017; Oeckinghaus *et al.*, 2011) y el receptor 1 de TNF α (TNFR1) (Hayden y Ghosh, 2004; Oeckinghaus *et al.*, 2011), ambos expresados por las células del epéndimo (Chakravarty y Herkenham, 2005; Fernández-Arjona *et al.*, 2021) (Figura 16). Esto explicaría el efecto sobre la alteración de la diferenciación de los PEP observado en el presente trabajo *in vitro*.

En conjunto, las condiciones neuroinflamatorias asociadas a la HPH, y desencadenadas por la HMG/HIV, son desfavorables para la diferenciación de los PEP al promover indirectamente la ubiquitinación y degradación del factor de transcripción

Foxj1. Esto conduce a una pérdida del estado maduro multiciliado de las células del epéndimo (Figura 16), en consonancia con lo observado empíricamente en el presente trabajo mediante los cultivos *in vitro* de PEP.

Por otro lado, se debe tener en cuenta lo que se conoce sobre cómo se afecta el epéndimo por algunos de los productos de degradación de los eritrocitos como son la peroxiredoxina 2 (PRX2), la hemoglobina y los iones del hierro (Bian *et al.*, 2020; Gao *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2002); además de la trombina y el ácido lisofosfatídico presentes en el plasma (Peng *et al.*, 2021). PRX2 es una proteína muy abundante en eritrocitos. A pesar de tener una función antiinflamatoria intracelular, en el medio extracelular actúa como un mediador inflamatorio, como patrón molecular asociado a daño (DAMP, *Damage-Associated Molecular Pattern*). Se le atribuye la capacidad de causar edema cerebral, degeneración neuronal y disrupción de la barrera hematoencefálica, entre otros efectos (Bian *et al.*, 2020). Por otro lado, el hierro (tanto el ion ferroso como el ion férrico) y la trombina están asociados al desarrollo de HPH a partir de HIV. El hierro en altas concentraciones es productor de radicales libres y causante de daño oxidativo y se le atribuye la capacidad de causar la pérdida de cilios y la muerte en las células del epéndimo (Gao *et al.*, 2014). La hemoglobina, además de liberar hierro en su degradación, con todo lo que ello conlleva, es un agente que promueve la peroxidación lipídica, causando daño oxidativo en las membranas de las células que afecta (Huang *et al.*, 2002). La bilirrubina, uno de los subproductos de degradación de la hemoglobina, causa daño mitocondrial, disrupción de la síntesis de ADN y proteínas, además de anomalías en el transporte iónico (Huang *et al.*, 2002), en el que el epéndimo está profundamente implicado (Jiménez *et al.*, 2014; MacAulay y Zeuthen, 2010). En lo relativo a la trombina, existe evidencia de que causa pérdida de epéndimo (Peng *et al.*, 2021), al igual que en el caso del ácido lisofosfatídico, que es un lípido señalizador descrito como causante de la muerte de las células endimarias (Lummis *et al.*, 2019). En suma, hay evidencia suficiente que respalda el efecto nocivo observado sobre el epéndimo por parte de las condiciones hemorrágicas estudiadas.

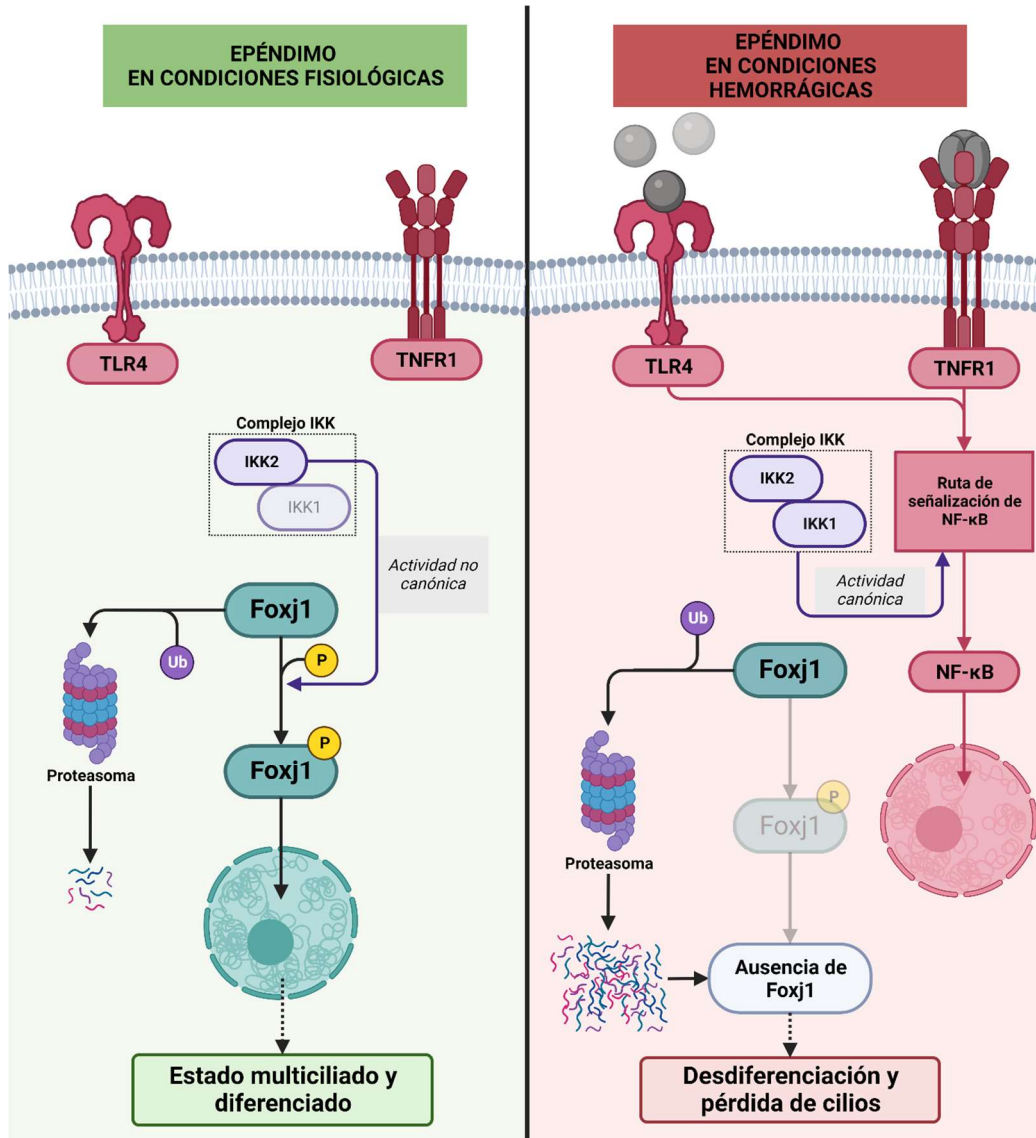


Figura 16. Foxx1 y los mecanismos moleculares que rigen la diferenciación de las células endodermiales. **Izquierda.** Se representa esquemáticamente la relevancia de Foxx1 como factor de transcripción en la diferenciación de los progenitores del epéndimo a células del epéndimo diferenciadas y multiciliadas. Foxx1 es un factor de transcripción con una vida media muy corta, al ser rápidamente ubiquitinado (Ub, ubiquitina) y degradado por el proteasoma. La fosforilación (P) de Foxx1 por la kinasa IKK2 del complejo IKK, mediante una actividad no canónica, previene la ubiquitinación de Foxx1. Esto permite la entrada de Foxx1 en el núcleo y la adquisición de un estado maduro y multiciliado en las células del epéndimo. **Derecha.** En condiciones de hemorragia, donde hay presencia de sangre y citoquinas como el TNF α , se da la activación de los receptores Toll-like 4 (TLR4) y los receptores 1 de TNF α (TNFR1) por sus respectivos ligandos. Ambos receptores se encuentran presentes en la membrana de las células del linaje endodermial. Estos receptores activan la ruta de señalización intracelular de NF- κ B, que requiere de la actividad canónica del complejo IKK. En estas condiciones, IKK2 no fosforila a Foxx1, que es degradado por el proteasoma. En consecuencia, las células del epéndimo no pueden mantener su estado diferenciado y multiciliado. Figura de elaboración propia. Creado con BioRender.com.

En cuanto a la mayor recuperación de la diferenciación de los PEp observada en el presente trabajo en presencia de suero sanguíneo con respecto a la sangre, podría explicarse al no haber eritrocitos en el suero sanguíneo (Tuck *et al.*, 2009). Por tanto, los productos procedentes de la lisis de los eritrocitos ya mencionados no estarían presentes en las condiciones donde se aplicó suero sanguíneo y no se observarían sus efectos perjudiciales. Se debe destacar que en los experimentos del presente trabajo en ningún caso se están retirando los restos celulares en los cambios de medio, por lo que permanecen durante la duración del cultivo *in vitro*. En cambio, las proteínas séricas podrían perder actividad biológica con el paso de los días, lo que podría justificar en parte las diferencias observadas entre sangre completa y suero sanguíneo a los días 6 y 9.

Efecto del ambiente de cocultivo con CMM en la supervivencia y diferenciación de los PEp

En este trabajo, se ha podido observar cómo las CMM proveen un ambiente apropiado para la supervivencia y correcta diferenciación de los PEp, en consonancia con sus propiedades inmunomoduladoras y neuroprotectoras ampliamente probadas (Maegele y Schaefer, 2009; Parr *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2020). Más allá de ser capaces de acelerar la diferenciación y maduración de los PEp *in vitro*, las propiedades terapéuticas de las CMM han podido observarse en el presente trabajo cuando se aplicaron en los cultivos primarios de PEp en condiciones hemorrágicas y cuando se cotrasplantaron en los cultivos organotípicos de pared ventricular dañada por la HMG/HPH con PEp.

En situaciones adversas, como las presentes durante la HMG/HIV y la HPH a excepción de la sangre completa, se ha podido comprobar que las CMM son capaces de estabilizar a los PEp. Esto puede deberse a su actividad secretora de factores de crecimiento y citoquinas (Keshtkar *et al.*, 2018; Parr *et al.*, 2007). Esto permitiría la adquisición del estado diferenciado y multiciliado del epéndimo generado por los PEp. Está ampliamente demostrado que las CMM pueden responder a estímulos inflamatorios a fin de contrarrestarlos. En concreto, se ha descrito que el TNF α se une y activa su receptor 2 de TNF α (TNFR2), de forma que se desencadena una respuesta antiinflamatoria mediante la secreción de factor de crecimiento transformante β

(TFG β) e interleuquina 10 (IL-10) (Beldi *et al.* 2020a, b). Por tanto, un análisis cuantitativo de la presencia de determinados factores antiinflamatorios, tanto en el medio de cultivo como en las CMM, en las condiciones experimentales usadas, puede ser interesante para probar las vías de señalización concretas implicadas en la estabilización del epéndimo.

Por otro lado, se debe tener en cuenta la capacidad descrita para las CMM de prevenir la apoptosis en las células bajo su ambiente de influencia (Murphy *et al.*, 2013). Este hecho explicaría el aumento de la supervivencia de los PEp trasplantados en explantes que desarrollan HMG/HPH moderada. Por desgracia, este efecto no pudo advertirse en los explantes clasificados como HMG/HPH severa, posiblemente porque el daño en el tejido sea demasiado grave. Para demostrar este efecto, en el futuro debería cuantificarse la tasa de apoptosis en las condiciones de este trabajo.

En lo que concierne al efecto de las CMM sobre la proporción de células ciliadas que expresan Foxj1, que surgen a partir de los PEp trasplantados, puede considerarse un resultado positivo, puesto que sugiere que las CMM no son capaces de alterar el compromiso de diferenciación de los PEp. Dicho de otro modo, las CMM simplemente promoverían el entorno adecuado para la estabilización, supervivencia y diferenciación de los PEp conforme a su propio programa genético. También, este resultado apoya las evidencias dadas en otros estudios en enfermedades neurodegenerativas, que indican que las CMM no se transdiferencian en PEp ni en otro tipo de células neurales. La ausencia de transdiferenciación de las CMM en condiciones de hidrocefalia ha podido ser probada en estudios en un modelo animal de hidrocefalia congénita con origen genético (García-Bonilla *et al.*, 2020, 2023).

En conjunto, los resultados mostrados en el presente trabajo ofrecen indicios preliminares y prometedores acerca del uso combinado de los PEp y las CMM con fines terapéuticos en la HPH originada por HMG/HIV. No obstante, sería necesario indagar en la totalidad de los efectos que este trasplante pudiera generar sobre aspectos como podrían ser la actividad de la microglía y astrogía en el entorno de la pared ventricular, la mielinización por parte de la oligodendroglía y la integridad de los nichos de células madre neurales adultas de la zona subventricular.

CONCLUSIONES

Mediante este trabajo se ha podido comprobar, experimentalmente *in vitro*, que las condiciones presentes en HMG y HIV conducentes a la HPH perjudican la diferenciación de los PEp en epéndimo maduro y multiciliado, el cual es necesario para el mantenimiento de la homeostasis y funcionamiento del tejido nervioso. Sin embargo, las CMM permiten aumentar tanto la supervivencia de los PEp trasplantados como la tasa de epéndimo multiciliado diferenciado que generan, lo que en última instancia supondría el restablecimiento parcial de las funciones que desempeña este epitelio. Por tanto, un tratamiento basado en el cotrasplante de PEp y CMM se presenta como una forma de terapia prometedora para los pacientes que sufren HMG/HIV y desarrollan HPH.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdi, K., Lai, C. H., Paez-Gonzalez, P., Lay, M., Pyun, J., y Kuo, C. T. (2018). Uncovering inherent cellular plasticity of multiciliated ependyma leading to ventricular wall transformation and hydrocephalus. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03812-w>
- Angevine, J. B., Bodian, D., Coulombre, A. J., Edds, M. V., Hamburger, V., Jacobson, M., Lyser, K. M., Prestige, M. C., Sidman, R. L., Varon, S., y Weiss, P. A. (1970). Embryonic vertebrate central nervous system: Revised terminology. *The Anatomical Record*, 166(2), 257-261. <https://doi.org/10.1002/AR.1091660214>
- Ballabh, P. (2010). Intraventricular hemorrhage in premature infants: Mechanism of disease. *Pediatric Research*, 67(1), 1-8. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181c1b176>
- Ballabh, P. (2014). Pathogenesis and prevention of intraventricular hemorrhage. *Clinics in Perinatology*, 41(1), 47-67. <https://doi.org/10.1016/J.CLP.2013.09.007>
- Beldi, G., Bahiraii, S., Lezin, C., Nouri Barkestani, M., Abdelgawad, M. E., Uzan, G., y Naserian, S. (2020). TNFR2 is a crucial hub controlling mesenchymal stem cell biological and functional properties. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 1408. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.596831>
- Beldi, G., Khosravi, M., Abdelgawad, M. E., Salomon, B. L., Uzan, G., Haouas, H., y Naserian, S. (2020). TNF α /TNFR2 signaling pathway: An active immune checkpoint for mesenchymal stem cell immunoregulatory function. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/S13287-020-01740-5>
- Benner, E. J., Luciano, D., Jo, R., Abdi, K., Paez-Gonzalez, P., Sheng, H., Warner, D. S., Liu, C., Eroglu, C., y Kuo, C. T. (2013). Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4. *Nature*, 497(7449), 369-373. <https://doi.org/10.1038/NATURE12069>
- Bian, L., Zhang, J., Wang, M., Keep, R. F., Xi, G., y Hua, Y. (2020). Intracerebral hemorrhage-induced brain injury in rats: the role of extracellular peroxiredoxin 2. *Translational Stroke Research*, 11(2), 288-295. <https://doi.org/10.1007/S12975-019-00714-X>
- Bramall, A. N., Anton, E. S., Kahle, K. T., y Fecci, P. E. (2022). Navigating the ventricles: Novel insights into the pathogenesis of hydrocephalus. *eBioMedicine*, 78, 103931. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2022.103931>
- Bruni, J. E., Del Bigio, M. R., y Clattenburg, R. E. (1985). Ependyma: Normal and pathological. A review of the literature. *Brain Research Reviews*, 9(1), 1-19. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(85\)90016-5](https://doi.org/10.1016/0165-0173(85)90016-5)
- Canova, C., Neal, J. W., y Gasque, P. (2006). Expression of innate immune complement regulators on brain epithelial cells during human bacterial meningitis. *Journal of Neuroinflammation*, 3(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-3-22>

- Chakravarty, S., y Herkenham, M. (2005). Toll-Like Receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS Inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *Journal of Neuroscience*, 25(7), 1788-1796. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4268-04.2005>
- Cohen, S., y Flibotte, J. (2022). Treatment of posthemorrhagic hydrocephalus. *Clinics in Perinatology*, 49(1), 15-25. <https://doi.org/10.1016/J.CLP.2021.11.002>
- Dawes, W. (2022). Secondary brain injury following neonatal intraventricular hemorrhage: the role of the ciliated ependyma. *Frontiers in Pediatrics*, 10. <https://doi.org/10.3389/FPED.2022.887606>
- Deckert-Schlüter, M., Schlüter, D., Hof, H., Wiestler, O. D., y Lassmann, H. (1994). Differential expression of ICAM-1, VCAM-1 and their ligands LFA-1, Mac-1, CD43, VLA-4, and MHC class II antigens in murine Toxoplasma encephalitis: a light microscopic and ultrastructural immunohistochemical study. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 53(5), 457-468. <https://doi.org/10.1097/00005072-199409000-00005>
- Del Bigio, M. R. (1995). The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia*, 14(1), 1-13. <https://doi.org/10.1002/GLIA.440140102>
- Del Bigio, M. R. (2010). Ependymal cells: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 55-73. <https://doi.org/10.1007/S00401-009-0624-Y>
- Delhaye, S., Paul, S., Blakqori, G., Minet, M., Weber, F., Staeheli, P., y Michiels, T. (2006). Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(20), 7835-7840. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0602460103>
- Ding, D. C., Shyu, W. C., y Lin, S. Z. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*, 20(1), 5-14. <https://doi.org/10.3727/096368910X>
- Doetsch, F., García-Verdugo, J. M., y Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of Neuroscience*, 17(13), 5046-5061. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-13-05046.1997>
- Fagan, A. M., y Perrin, R. J. (2012). Upcoming candidate cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimers disease. *Biomarkers in Medicine*, 6(4), 455-476. <https://doi.org/10.2217/BMM.12.42>
- Fam, M. D., Zeineddine, H. A., Eliyas, J. K., Stadnik, A., Jesselson, M., McBee, N., Lane, K., Cao, Y., Wu, M., Zhang, L., Thompson, R. E., John, S., Ziai, W., Hanley, D. F., y Awad, I. A. (2017). CSF inflammatory response after intraventricular hemorrhage. *Neurology*, 89(15), 1553-1560. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004493>
- Fang, H., Wu, Y., Huang, X., Wang, W., Ang, B., Cao, X., y Wan, T. (2011). Toll-like Receptor 4 (TLR4) is essential for Hsp70-like protein 1 (HSP70L1) to activate dendritic cells and induce Th1 response. *Journal of Biological Chemistry*, 286(35), 30393-30400. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.266528>

- Fernández-Arjona, M. del M., León-Rodríguez, A., López-Ávalos, M. D., y Grondona, J. M. (2021). Microglia activated by microbial neuraminidase contributes to ependymal cell death. *Fluids and Barriers of the CNS*, 18(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/S12987-021-00249-0>
- Gao, C., Du, H., Hua, Y., Keep, R. F., Strahle, J., y Xi, G. (2014). Role of red blood cell lysis and iron in hydrocephalus after intraventricular hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 34(6), 1070-1075. <https://doi.org/10.1038/JCBFM.2014.56>
- García-Bonilla, M., Ojeda-Pérez, B., García-Martín, M. L., Muñoz-Hernández, M. C., Vitorica, J., Jiménez, S., Cifuentes, M., Santos-Ruiz, L., Shumilov, K., Claros, S., Gutiérrez, A., Páez-González, P., y Jiménez, A. J. (2020). Neocortical tissue recovery in severe congenital obstructive hydrocephalus after intraventricular administration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/S13287-020-01626-6>
- García-Bonilla, M., Ojeda-Pérez, B., Shumilov, K., Rodríguez-Pérez, L.-M., Domínguez-Pinos, D., Vitorica, J., Jiménez, S., Ramírez-Lorca, R., Echevarría, M., Cárdenas-García, C., Iglesias, T., Gutiérrez, A., McAllister, J. P., Limbrick, D. D., Páez-González, P., y Jiménez, A. J. (2023). Generation of periventricular reactive astrocytes overexpressing Aquaporin 4 is stimulated by mesenchymal stem cell therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5640. <https://doi.org/10.3390/IJMS24065640/S1>
- Gee, P., Rhodes, C. H., Fricker, L. D., y Angeletti, R. H. (1993). Expression of neuropeptide processing enzymes and neurosecretory proteins in ependyma and choroid plexus epithelium. *Brain Research*, 617(2), 238-248. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91091-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91091-6)
- Ginhoux, F., y Prinz, M. (2015). Origin of Microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A020537>
- Gong, C., Qin, Z., Betz, A. L., Liu, X. H., y Yang, G. Y. (1998). Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Research*, 801(1-2), 1-8. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00489-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00489-2)
- Gould, S. J., Howard, S., y Papadaki, L. (1990). The development of ependyma in the human fetal brain: an immunohistological and electron microscopic study. *Developmental Brain Research*, 55(2), 255-267. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(90\)90207-F](https://doi.org/10.1016/0165-3806(90)90207-F)
- Halleivi, H., Walker, K. C., Kasam, M., Bornstein, N., Grotta, J. C., y Savitz, S. I. (2012). Inflammatory response to intraventricular hemorrhage: time course, magnitude and effect of t-PA. *Journal of the Neurological Sciences*, 315(1-2), 93-95. <https://doi.org/10.1016/J.JNS.2011.11.019>
- Hayden, M. S., y Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes & Development*, 18(18), 2195-2224. <https://doi.org/10.1101/GAD.1228704>

- Holste, K. G., Xia, F., Ye, F., Keep, R. F., y Xi, G. (2022). Mechanisms of neuroinflammation in hydrocephalus after intraventricular hemorrhage: a review. *Fluids and Barriers of the CNS*, 19(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/S12987-022-00324-0>
- Howard, B. M., Mo, Z., Filipovic, R., Moore, A. R., Antic, S. D., y Zecevic, N. (2008). Radial glia cells in the developing human brain. *The Neuroscientist*, 14(5), 459. <https://doi.org/10.1177/1073858407313512>
- Huang, F. P., Xi, G., Keep, R. F., Hua, Y., Nemoianu, A., y Hoff, J. T. (2002). Brain edema after experimental intracerebral hemorrhage: role of hemoglobin degradation products. *Journal of Neurosurgery*, 96(2), 287-293. <https://doi.org/10.3171/JNS.2002.96.2.0287>
- Jacquet, B. V., Salinas-Mondragon, R., Liang, H., Therit, B., Buie, J. D., Dykstra, M., Campbell, K., Ostrowski, L. E., Brody, S. L., y Ghashghaei, H. T. (2009). FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain. *Development*, 136(23), 4021-4031. <https://doi.org/10.1242/DEV.041129>
- Jessen, N. A., Munk, A. S. F., Lundgaard, I., y Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochemical Research*, 40(12), 2583-2599. <https://doi.org/10.1007/S11064-015-1581-6>
- Jiménez, A. J., Domínguez-Pinos, M. D., Guerra, M. M., Fernández-Llebrez, P., y Pérez-Fígares, J. M. (2014). Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers*, 2(1). <https://doi.org/10.4161/TISB.28426>
- Jones, H. C., y Bucknall, R. M. (1988). Inherited prenatal hydrocephalus in the H-Tx rat: a morphological study. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 14(4), 263-274. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2990.1988.TB00887.X>
- Jones, R. F., Stening, W. A., y Brydon, M. (1990). Endoscopic third ventriculostomy. *Neurosurgery*, 26(1), 86. <https://doi.org/10.1097/00006123-199001000-00012>
- Kahle, K. T., Kulkarni, A. V., Limbrick, D. D., y Warf, B. C. (2016). Hydrocephalus in children. *Lancet*, 387(10020), 788-799. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60694-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60694-8)
- Karimy, J. K., Reeves, B. C., Damisah, E., Duy, P. Q., Antwi, P., David, W., Wang, K., Schiff, S. J., Limbrick, D. D., Alper, S. L., Warf, B. C., Nedergaard, M., Simard, J. M., y Kahle, K. T. (2020). Inflammation in acquired hydrocephalus: pathogenic mechanisms and therapeutic targets. *Nature Reviews Neurology*, 16(5), 285-296. <https://doi.org/10.1038/S41582-020-0321-Y>
- Karimy, J. K., Zhang, J., Kurland, D. B., Theriault, B. C., Duran, D., Stokum, J. A., Furey, C. G., Zhou, X., Mansuri, M. S., Montejo, J., Vera, A., Diluna, M. L., Delpire, E., Alper, S. L., Gunel, M., Gerzanich, V., Medzhitov, R., Simard, J. M., y Kahle, K. T. (2017). Inflammation-dependent cerebrospinal fluid hypersecretion by the

- choroid plexus epithelium in posthemorrhagic hydrocephalus. *Nature Medicine*, 23(8), 997-1003. <https://doi.org/10.1038/NM.4361>
- Keshtkar, S., Azarpira, N., y Ghahremani, M. H. (2018). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/S13287-018-0791-7>
- Kishimoto, N., y Sawamoto, K. (2012). Planar polarity of ependymal cilia. *Differentiation*, 83(2). <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.10.007>
- Korzh, V. (2018). Development of brain ventricular system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(3), 375-383. <https://doi.org/10.1007/S00018-017-2605-Y>
- Kriegstein, A., y Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 149. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.051508.135600>
- Kriegstein, A. R., y Götz, M. (2003). Radial glia diversity: A matter of cell fate. *Glia*, 43(1), 37-43. <https://doi.org/10.1002/glia.10250>
- Kulkarni, A. V. (2010). Quality of life in childhood hydrocephalus: a review. *Child's Nervous System*, 26(6), 737-743. <https://doi.org/10.1007/S00381-010-1131-0>
- Kwon, M. S., Woo, S. K., Kurland, D. B., Yoon, S. H., Palmer, A. F., Banerjee, U., Iqbal, S., Ivanova, S., Gerzanich, V., y Simard, J. M. (2015). Methemoglobin Is an endogenous Toll-Like Receptor 4 ligand - relevance to subarachnoid hemorrhage. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 5028-5046. <https://doi.org/10.3390/IJMS16035028>
- Lacy, M., Baldassarre, M., Nader, T., y Frim, D. (2012). Parent ratings of executive functioning in children with shunted hydrocephalus. *Pediatric Neurosurgery*, 48(2), 73-79. <https://doi.org/10.1159/000339313>
- Lacy, M., Pyykkonen, B. A., Hunter, S. J., Do, T., Oliveira, M., Austria, E., Mottlow, D., Larson, E., y Frim, D. (2008). Intellectual functioning in children with early shunted posthemorrhagic hydrocephalus. *Pediatric Neurosurgery*, 44(5), 376-381. <https://doi.org/10.1159/000149904>
- Lan, X., Han, X., Li, Q., Yang, Q. W., y Wang, J. (2017). Modulators of microglial activation and polarization after intracerebral haemorrhage. *Nature Reviews Neurology*, 13(7), 420-433. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2017.69>
- Leijser, L. M., y de Vries, L. S. (2019). Preterm brain injury: Germinal matrix–intraventricular hemorrhage and post-hemorrhagic ventricular dilatation. *Handbook of Clinical Neurology*, 162, 173-199. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64029-1.00008-4>
- Li, H., Ghazanfari, R., Zacharaki, D., Lim, H. C., y Scheduling, S. (2016). Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1370(1), 109-118. <https://doi.org/10.1111/NYAS.13102>

- Lim, D. A., Tramontin, A. D., Trevejo, J. M., Herrera, D. G., García-Verdugo, J. M., y Alvarez-Buylla, A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*, 28(3), 713-726. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00148-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00148-3)
- Lindquist, B., Persson, E. K., Uvebrant, P., y Carlsson, G. (2008). Learning, memory and executive functions in children with hydrocephalus. *Acta Paediatrica*, 97(5), 596-601. <https://doi.org/10.1111/J.1651-2227.2008.00747.X>
- Liu, Z. J., Zhuge, Y., y Velazquez, O. C. (2009). Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 106(6), 984-991. <https://doi.org/10.1002/JCB.22091>
- Lo Furno, D., Mannino, G., y Giuffrida, R. (2018). Functional role of mesenchymal stem cells in the treatment of chronic neurodegenerative diseases. *Journal of Cellular Physiology*, 233(5), 3982-3999. <https://doi.org/10.1002/JCP.26192>
- Lolansén, S. D., Rostgaard, N., Barbuskaite, D., Capión, T., Olsen, M. H., Norager, N. H., Vilhardt, F., Andreassen, S. N., Toft-Bertelsen, T. L., Ye, F., Juhler, M., Keep, R. F., y MacAulay, N. (2022). Posthemorrhagic hydrocephalus associates with elevated inflammation and CSF hypersecretion via activation of choroidal transporters. *Fluids and barriers of the CNS*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S12987-022-00360-W>
- Lowery, L. A., y Sive, H. (2009). Totally tubular: the mystery behind function and origin of the brain ventricular system. *BioEssays*, 31(4), 446-458. <https://doi.org/10.1002/BIES.200800207>
- Lummi, N. C., Sánchez-Pavón, P., Kennedy, G., Frantz, A. J., Kihara, Y., Blaho, V. A., y Chun, J. (2019). LPA1/3 overactivation induces neonatal posthemorrhagic hydrocephalus through ependymal loss and ciliary dysfunction. *Science Advances*, 5(10), eaax2011. <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAX2011>
- Luo, J., Luo, Y., Zeng, H., Reis, C., y Chen, S. (2019). Research advances of germinal matrix hemorrhage: an update review. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 39(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/S10571-018-0630-5>
- MacAulay, N., y Zeuthen, T. (2010). Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters. *Neuroscience*, 168(4), 941-956. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2009.09.016>
- Macrin, D., Joseph, J. P., Pillai, A. A., y Devi, A. (2017). Eminent sources of adult mesenchymal stem cells and their therapeutic imminence. *Stem Cell Reviews and Reports*, 13(6), 741-756. <https://doi.org/10.1007/S12015-017-9759-8>
- Maegele, M., y Schaefer, U. (2009). Stem cell-based cellular replacement strategies following traumatic brain injury (TBI). *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies*, 17(2), 119-131. <https://doi.org/10.1080/13645700801970087>
- Malagón-Valdez, J. (2006). Hidrocefalia congénita. *Revista de Neurología*, 42(Supl. 3). <https://doi.org/10.33588/rn.42s03.2006055>

- Malatesta, P., Appolloni, I., y Calzolari, F. (2008). Radial glia and neural stem cells. *Cell and Tissue Research*, 331(1), 165-178. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0481-8>
- Marshall, W. F. (2010). Cilia self-organize in response to planar cell polarity and flow. *Nature Cell Biology*, 12(4), 314-315. <https://doi.org/10.1038/ncb0410-314>
- Mazzola, C. A., Choudhri, A. F., Auguste, K. I., Limbrick, D., Rogido, M., Mitchell, L., y Flannery, A. M. (2014). Pediatric hydrocephalus: Systematic literature review and evidence-based guidelines. Part 2: Management of posthemorrhagic hydrocephalus in premature infants. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, 14(Supl. 1), 8-23. <https://doi.org/10.3171/2014.7.PEDS14322>
- McAllister, J. P. (2012). Pathophysiology of congenital and neonatal hydrocephalus. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 17(5), 285-294. <https://doi.org/10.1016/J.SINY.2012.06.004>
- McAllister, J. P., Guerra, M. M., Ruiz, L. C., Jimenez, A. J., Dominguez-Pinos, D., Sival, D., den Dunnen, W., Morales, D. M., Schmidt, R. E., Rodriguez, E. M., y Limbrick, D. D. (2017). Ventricular zone disruption in human neonates with intraventricular hemorrhage. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 76(5), 358-375. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlx017>
- Merkle, F. T., y Alvarez-Buylla, A. (2006). Neural stem cells in mammalian development. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(6), 704-709. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.09.008>
- Mirzadeh, Z., Doetsch, F., Sawamoto, K., Wichterle, H., y Alvarez-Buylla, A. (2010). The Subventricular Zone En-face: wholemount staining and ependymal flow. *Journal of Visualized Experiments*, 39, e1938. <https://doi.org/10.3791/1938>
- Mirzadeh, Z., Han, Y. G., Soriano-Navarro, M., García-Verdugo, J. M., y Alvarez-Buylla, A. (2010). Cilia organize ependymal planar polarity. *The Journal of Neuroscience*, 30(7), 2600-2610. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3744-09.2010>
- Mirzadeh, Z., Merkle, F. T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J. M., y Alvarez-Buylla, A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*, 3(3), 265-278. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2008.07.004>
- Mohammad, K., Scott, J. N., Leijser, L. M., Zein, H., Afifi, J., Piedboeuf, B., de Vries, L. S., van Wezel-Meijler, G., Lee, S. K., y Shah, P. S. (2021). Consensus approach for standardizing the screening and classification of preterm brain injury diagnosed with cranial ultrasound: a canadian perspective. *Frontiers in Pediatrics*, 9. <https://doi.org/10.3389/FPED.2021.618236>
- Mori, K. (2000). Actualities in hydrocephalus classification and management possibilities. *Neurological Research*, 22(1), 127-130. <https://doi.org/10.1080/01616412.2000.11741048>

- Mortazavi, M. M., Adeeb, N., Griessenauer, C. J., Sheikh, H., Shahidi, S., Tubbs, R. I., y Tubbs, R. S. (2014). The ventricular system of the brain: a comprehensive review of its history, anatomy, histology, embryology, and surgical considerations. *Child's Nervous System*, 30(1), 19-35. <https://doi.org/10.1007/S00381-013-2321-3>
- Moyes, P. D. (1968). Hydrocephalus. *Canadian Medical Association Journal*, 98(7), 354. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1923832/>
- Murphy, M. B., Moncivais, K., y Caplan, A. I. (2013). Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & Molecular Medicine*, 45(11). <https://doi.org/10.1038/EMM.2013.94>
- Murray, S. A., Morgan, J. L., Kane, C., Sharma, Y., Heffner, C. S., Lake, J., y Donahue, L. R. (2010). Mouse gestation length is genetically determined. *PLOS ONE*, 5(8), e12418. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0012418>
- Neal, J. W., y Gasque, P. (2013). How does the brain limit the severity of inflammation and tissue injury during bacterial meningitis? *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 72(5), 370-385. <https://doi.org/10.1097/NEN.0B013E3182909F2F>
- Nelles, D. G., y Hazrati, L. N. (2022). Ependymal cells and neurodegenerative disease: outcomes of compromised ependymal barrier function. *Brain Communications*, 4(6). <https://doi.org/10.1093/BRAINCOMMS/FCAC288>
- Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., y Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature Neuroscience*, 7(2), 136-144. <https://doi.org/10.1038/NN1172>
- Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., y Kriegstein, A. R. (2008). Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *The Journal of Comparative Neurology*, 508(1), 28-44. <https://doi.org/10.1002/CNE.21669>
- Oeckinghaus, A., Hayden, M. S., y Ghosh, S. (2011). Crosstalk in NF-κB signaling pathways. *Nature Immunology*, 12(8), 695-708. <https://doi.org/10.1038/ni.2065>
- Paez-Gonzalez, P., Abdi, K., Luciano, D., Liu, Y., Soriano-Navarro, M., Rawlins, E., Bennett, V., Garcia-Verdugo, J. M., y Kuo, C. T. (2011). Ank3-dependent SVZ niche assembly is required for the continued production of new neurons. *Neuron*, 71(1), 61-75. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2011.05.029>
- Paez-Gonzalez, P., Asrican, B., Rodriguez, E., y Kuo, C. T. (2014). Identification of distinct ChAT⁺ neurons and activity-dependent control of postnatal SVZ neurogenesis. *Nature Neuroscience*, 17(7), 934-942. <https://doi.org/10.1038/NN.3734>
- Papile, L. A., Burstein, J., Burstein, R., y Koffler, H. (1978). Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *The Journal of Pediatrics*, 92(4), 529-534. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(78\)80282-0](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(78)80282-0)

- Paredes, M. F., Mora, C., Flores-Ramirez, Q., Cebrian-Silla, A., Del Dosso, A., Larimer, P., Chen, J., Kang, G., Granero, S. G., Garcia, E., Chu, J., Delgado, R., Cotter, J. A., Tang, V., Spatazza, J., Obernier, K., Lozano, J. F., Vento, M., Scott, J., ... Huang, E. J. (2022). Nests of dividing neuroblasts sustain interneuron production for the developing human brain. *Science*, 375(6579). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABK2346>
- Parodi, A., Govaert, P., Horsch, S., Bravo, M. C., Ramenghi, L. A., Agut, T., Alarcon, A., Arena, R., Bartocci, M., Bravo, M., Cabañas, F., Carreras, N., Claris, O., Dudink, J., Fumagalli, M., Govaert, P., Horsch, S., Parodi, A., Pellicer, A., ... Valverde, E. (2020). Cranial ultrasound findings in preterm germinal matrix haemorrhage, sequelae and outcome. *Pediatric Research*, 87(Supl. 1), 13-24. <https://doi.org/10.1038/S41390-020-0780-2>
- Parr, A. M., Tator, C. H., y Keating, A. (2007). Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplantation*, 40(7), 609-619. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705757>
- Peng, K., Koduri, S., Xia, F., Gao, F., Hua, Y., Keep, R. F., y Xi, G. (2021). Impact of sex differences on thrombin-induced hydrocephalus and white matter injury: the role of neutrophils. *Fluids and Barriers of the CNS*, 18(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/S12987-021-00273-0>
- Peretto, P., Dati, C., De Marchis, S., Kim, H. H., Ukhanova, M., Fasolo, A., y Margolis, F. L. (2004). Expression of the secreted factors noggin and bone morphogenetic proteins in the subependymal layer and olfactory bulb of the adult mouse brain. *Neuroscience*, 128(4), 685-696. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2004.06.053>
- Pérez-Fígares, J. M., Jimenez, A. J., y Rodríguez, E. M. (2001). Subcommissural organ, cerebrospinal fluid circulation, and hydrocephalus. *Microscopy Research and Technique*, 52(5), 591-607. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20010301\)52:5<591::AID-JEMT1043>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20010301)52:5<591::AID-JEMT1043>3.0.CO;2-7)
- Pople, I. K., y Ettles, D. (1995). The role of endoscopic choroid plexus coagulation in the management of hydrocephalus. *Neurosurgery*, 36(4), 698-702. <https://doi.org/10.1227/00006123-199504000-00009>
- Ransohoff, J., Shulman, K., y Fishman, R. A. (1960). Hydrocephalus: A review of etiology and treatment. *The Journal of Pediatrics*, 56(3), 399-411. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(60\)80193-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(60)80193-X)
- Rekate, H. L. (2008). The definition and classification of hydrocephalus: a personal recommendation to stimulate debate. *Cerebrospinal Fluid Research*, 5, 2. <https://doi.org/10.1186/1743-8454-5-2>
- Saker, E., Henry, B. M., Tomaszewski, K. A., Loukas, M., Iwanaga, J., Oskouian, R. J., y Tubbs, R. S. (2016). The human central canal of the spinal cord: a comprehensive review of its anatomy, embryology, molecular development, variants, and pathology. *Cureus*, 8(12). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.927>

- Sanai, N., Nguyen, T., Ihrie, R. A., Mirzadeh, Z., Tsai, H. H., Wong, M., Gupta, N., Berger, M. S., Huang, E., Garcia-Verdugo, J. M., Rowitch, D. H., y Alvarez-Buylla, A. (2011). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature*, 478(7369), 382-386. <https://doi.org/10.1038/NATURE10487>
- Sarnat, H. B. (1992). Role of human fetal ependyma. *Pediatric Neurology*, 8(3), 163-178. [https://doi.org/10.1016/0887-8994\(92\)90063-5](https://doi.org/10.1016/0887-8994(92)90063-5)
- Sevensky, R., Newville, J. C., Tang, H. L., Robinson, S., y Jantzie, L. L. (2021). Cumulative damage: cell death in posthemorrhagic hydrocephalus of prematurity. *Cells*, 10(8), 1911. <https://doi.org/10.3390/CELLS10081911>
- Smith, A. D., y Buckley, M. G. (2012). Spatial navigational impairments in hydrocephalus. *Cognitive Processing*, 13(Supl. 1). <https://doi.org/10.1007/S10339-012-0505-5>
- Spassky, N., Merkle, F. T., Flames, N., Tramontin, A. D., García-Verdugo, J. M., y Alvarez-Buylla, A. (2005). Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *The Journal of Neuroscience*, 25(1), 10-18. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1108-04.2005>
- Takahashi, K., y Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.07.024>
- Toft-Bertelsen, T. L., Barbuskaite, D., Heerfordt, E. K., Lolansen, S. D., Andreassen, S. N., Rostgaard, N., Olsen, M. H., Norager, N. H., Capion, T., Rath, M. F., Juhler, M., y MacAulay, N. (2022). Lysophosphatidic acid as a CSF lipid in posthemorrhagic hydrocephalus that drives CSF accumulation via TRPV4-induced hyperactivation of NKCC1. *Fluids and Barriers of the CNS*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12987-022-00361-9>
- Tramontin, A. D., García-Verdugo, J. M., Lim, D. A., y Alvarez-Buylla, A. (2003). Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): A continuum of the neural stem cell compartment. *Cerebral Cortex*, 13(6), 580-587. <https://doi.org/10.1093/cercor/13.6.580>
- Tsan, M. F., y Gao, B. (2004). Endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(3), 514-519. <https://doi.org/10.1189/JLB.0304127>
- Tsitouras, V., y Sgouros, S. (2011). Infantile posthemorrhagic hydrocephalus. *Child's Nervous System*, 27(10), 1595-1608. <https://doi.org/10.1007/S00381-011-1521-Y>
- Tuck, M. K., Chan, D. W., Chia, D., Godwin, A. K., Grizzle, W. E., Krueger, K. E., Rom, W., Sanda, M., Sorbara, L., Stass, S., Wang, W., y Brenner, D. E. (2009). Standard operating procedures for serum and plasma collection: Early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. *Journal of Proteome Research*, 8(1), 113-117. <https://doi.org/10.1021/PR800545Q>

- Tully, H. M., y Dobyns, W. B. (2014). Infantile hydrocephalus: a review of epidemiology, classification and causes. *European Journal of Medical Genetics*, 57(8), 359-368. <https://doi.org/10.1016/J.EJMG.2014.06.002>
- Valdez Sandoval, P., Hernández Rosales, P., Quiñones Hernández, D. G., Chavana Naranjo, E. A., y García Navarro, V. (2019). Intraventricular hemorrhage and posthemorrhagic hydrocephalus in preterm infants: diagnosis, classification, and treatment options. *Child's Nervous System*, 35(6), 917-927. <https://doi.org/10.1007/S00381-019-04127-X>
- Venero, J. L., Vizuete, M. L., Ilundáin, A. A., Machado, A., Echevarria, M., y Cano, J. (1999). Detailed localization of aquaporin-4 messenger RNA in the CNS: preferential expression in periventricular organs. *Neuroscience*, 94(1), 239-250. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00182-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00182-7)
- Volarevic, V., Gazdic, M., Simovic Markovic, B., Jovicic, N., Djonov, V., y Arsenijevic, N. (2017). Mesenchymal stem cell-derived factors: Immuno-modulatory effects and therapeutic potential. *BioFactors*, 43(5), 633-644. <https://doi.org/10.1002/BIOF.1374>
- Volkman, R., y Offen, D. (2017). Concise review: mesenchymal stem cells in neurodegenerative diseases. *Stem Cells*, 35(8), 1867-1880. <https://doi.org/10.1002/STEM.2651>
- Volpe, J. J. (1989). Intraventricular hemorrhage in the premature infant—current concepts. Part I. *Annals of Neurology*, 25(1), 3-11. <https://doi.org/10.1002/ANA.410250103>
- Volpe, J. J., Inder, T. E., Darras, B. T., de Vries, L. S., du Plessis, A. J., Neil, J. J., y Perlman, J. M. (2018). Volpe's Neurology of the Newborn. *Volpe's Neurology of the Newborn*, 1-1224. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-68825-0>
- Wang, J., Chen, Z., Sun, M., Xu, H., Gao, Y., Liu, J., y Li, M. (2020). Characterization and therapeutic applications of mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Tissue and Cell*, 64. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2020.101330>
- Warf, B. C. (2005). Comparison of endoscopic third ventriculostomy alone and combined with choroid plexus cauterization in infants younger than 1 year of age: a prospective study in 550 African children. *Journal of Neurosurgery*, 103(Supl. 6), 475-481. <https://doi.org/10.3171/PED.2005.103.6.0475>
- Whish, S., Dziegielewska, K. M., Møllgård, K., Noor, N. M., Liddelow, S. A., Habgood, M. D., Richardson, S. J., y Saunders, N. R. (2015). The inner CSF-brain barrier: developmentally controlled access to the brain via intercellular junctions. *Frontiers in Neuroscience*, 9(FEB). <https://doi.org/10.3389/FNINS.2015.00016>
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Mack, A. F., y Reichenbach, A. (2009). Ependymal Cells. *Encyclopedia of Neuroscience*, 1133-1140. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01001-9>

- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., y Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/S13287-019-1165-5>
- Zecevic, N. (2004). Specific characteristic of radial glia in the human fetal telencephalon. *Glia*, 48(1), 27-35. <https://doi.org/10.1002/GLIA.20044>
- Ziai, W. C., Parry-Jones, A. R., Thompson, C. B., Sansing, L. H., Mullen, M. T., Murthy, S. B., Mould, A., Nekoovaght-Tak, S., y Hanley, D. F. (2021). Early inflammatory cytokine expression in cerebrospinal fluid of patients with spontaneous intraventricular hemorrhage. *Biomolecules*, 11(8), 1123. <https://doi.org/10.3390/BIOM11081123/S1>

ANEXO A: SOLUCIONES

A.1 SOLUCIONES TAMPONADORAS

A.1.1 Tampón fosfato (PB) 0,2 M, pH 7,3

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 28,5 g
- KH_2PO_4 4,39 g
- H_2O destilada hasta 1 L

A.1.2 Tampón fosfato salino (PBS) 1x 0,01 M, pH 7,3

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1,9 g
- KH_2PO_4 0,43 g
- NaCl 7,22 g
- H_2O destilada hasta 1 L

A.2 SOLUCIONES FIJADORAS

A.2.1 Paraformaldehído al 4 % m/v en PB 0,1 M, pH 7,3

- Paraformaldehído (P6148, Sigma-Aldrich) 4 g
- PB 0,2 M, pH 7,3 50 mL
- H_2O destilada hasta 100 mL

A.3 SOLUCIONES PARA INMUNOFLUORESCENCIA

A.3.1 Solución bloqueadora de uniones inespecíficas

- Triton X-100 (X100, Sigma-Aldrich) 0,1 % v/v 100 μL
- Suero de burro (508837, ThermoFisher) 5 % v/v 5 mL
- PBS 0,01 M, pH 7,3 hasta 100 mL

A.3.2 Solución disolvente de anticuerpos

- Triton X-100 (X100, Sigma-Aldrich) 0,1 % v/v 100 μ L
- NaN₃ 0,01 % m/v 10 mg
- Suero de burro (508837, ThermoFisher) 5 % v/v 5 mL
- PBS 0,01 M, pH 7,3 hasta 100 MI

A.3.3 Solución para tinción de núcleos

- PBS 1x 0,01 M, pH 7,3 100 mL
- DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, 2116137, Invitrogen, Life Technologies Corporation, Eugene, Oregón, Estados Unidos) 0,5 mg

ANEXO B: MEDIOS Y PROTOCOLOS PARA CULTIVOS CELULARES

B.1 MEDIOS DE CULTIVO

B.1.1 Medio de cultivo para explantes (cultivos organotípicos)

- H₂O ultrapura
- Suero de caballo inactivado (H1138, Sigma-Aldrich) 25 % v/v
- D(+)-glucosa (G7021, Sigma-Aldrich) 40 mM
- HEPES (15630-056, Gibco, ThermoFisher) 26,6 mM pH 7,1
- NaCl 19,3 mM
- NaHCO₃ 5 mM
- Ácido ascórbico 511 µM
- CaCl₂ 2,7 mM
- MgSO₄ 2,5 mM
- Insulina (I6634, Sigma-Aldrich) 0,033 % v/v
- Penicilina-Estreptomicina (P0781, Sigma-Aldrich) 0,5 % v/v

Esterilizar mediante filtración a través de membrana de 0,2 µm. Conservar a 4 °C.

B.1.2 Medio de proliferación de progenitores ependimarios

- Medio Eagle modificado de Dulbecco (D6546, Sigma-Aldrich) 88 % v/v
- Suero fetal bovino inactivado (ver C.2.1) 10 % v/v
- L-glutamina 200mM (25030-081, Gibco) 1 % v/v
- Penicilina-estreptomicina (P0781, Sigma-Aldrich) 1 % v/v

Conservar a 4 °C.

B.1.3 Medio de diferenciación de progenitores endimarios

- Medio Eagle modificado de Dulbecco (D6546, Sigma-Aldrich) 96 % v/v
- Suero fetal bovino inactivado (ver C.2.1) 2 % v/v
- L-glutamina 200mM (25030-081, Gibco) 1 % v/v
- Penicilina-estreptomicina (P0781, Sigma-Aldrich) 1 % v/v

Conservar a 4 °C.

B.1.4 Medio completo de mesenquimales

- Medio Eagle modificado de Dulbecco (D6546, Sigma-Aldrich) 87,25 % v/v
- Suero fetal bovino inactivado (ver C.2.1) 10 % v/v
- L-glutamina 200mM 1,25 % v/v
- Penicilina-estreptomicina 1 % v/v
- Anfotericina B 0,5 % v/v

Conservar a 4 °C

B.2 PROTOCOLOS DE CULTIVOS CELULARES

B.2.1 Inactivación de suero fetal bovino

En condiciones de esterilidad.

- 1) Descongelar una botella de suero fetal bovino (FBS, T7524, Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) durante 2 días a 4 °C.
- 2) Calentar el FBS hasta alcanzar los 56 °C.
- 3) Al alcanzar los 56 °C mantener a esa temperatura durante 30 min.
- 4) Alicuotar el FBS.
- 5) Congelar a -20 °C hasta su uso.

B.2.2 Tratamiento de cubreobjetos con poli-D-lisina

En condiciones de esterilidad.

- 1) Esterilizar cubreobjetos redondos en etanol 70° durante 10 min.
- 2) Retirar el etanol 70° y dejar secar durante 30 min.
- 3) Pasar los cubreobjetos a una placa multipocillo.
- 4) Tratamiento con poli-D-lisina (P6407, Sigma-Aldrich) durante 15 min.
- 5) 2 lavados con tampón fosfato salino (PBS, ver Anexo A.1.2) durante 3 min.
- 6) Dejar secar los pocillos durante un mínimo de 3 h.
- 7) Añadir medio de cultivo necesario hasta que los cubreobjetos queden cubiertos completamente y guardar en estufa de cultivos celulares por un máximo de 48 h hasta su uso.

ANEXO C: INMUNOFLUORESCENCIA. ANTICUERPOS Y PROTOCOLOS

C.1 Anticuerpos

Anticuerpos primarios	Tipo	Dilución	Referencia
Anti- β IV-tubulina	IgG monoclonal, obtenido en ratón	1:400	T7941, Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos
Anti-Foxj1	IgG policlonal, obtenido en conejo	1:150	HPA005714, Sigma-Aldrich

Todos los anticuerpos primarios se diluyeron en solución disolvente de anticuerpos (ver Anexo A.3.2)

Anticuerpos secundarios	Tipo	Fluorocromo conjugado	Dilución	Referencia
Anti-IgG de ratón	IgG policlonal, obtenido en burro	Rhodamine Red-X (RRX)	1:1000	715-295-150, Jackson ImmunoResearch, Ely, Reino Unido
Anti-IgG de conejo	IgG policlonal, obtenido en burro	Cy5	1:1000	711-175-152, Jackson ImmunoResearch

Todos los anticuerpos secundarios se diluyeron en solución disolvente de anticuerpos (ver Anexo A.3.2)

C.2 Protocolo para inmunofluorescencia sobre cultivos primarios de progenitores endimarios

- 1) Fijación en paraformaldehído al 4 % m/v en PB 0,1 M, pH 7,3 (ver Anexo A.2.1) durante 30 min a 4 °C de temperatura.
- 2) 3 lavados de 10 min con PBS 0,01 M, pH 7,3 (ver Anexo A.1.2).
- 3) Bloqueo mediante solución de uniones inespecíficas (ver Anexo A.3.1) 2 h a temperatura ambiente.
- 4) Incubación en anticuerpo primario: anti- β IV-tubulina, durante 48 h a 4 °C.
- 5) 3 lavados de 10 min con PBS 0,01 M, pH 7,3.
- 6) Incubación en anticuerpo secundario: anti-IgG de ratón, durante 1 h a temperatura ambiente.
- 7) 3 lavados de 10 min con PBS 0,01 M, pH 7,3.
- 8) Tinción nuclear con DAPI con solución para tinción de núcleos (ver Anexo A.3.3) durante 2 h a temperatura ambiente.
- 9) 3 lavados de 10 min con PBS 0,01 M, pH 7,3.

10) Montaje de las muestras con medio de montaje para fluorescencia (345789, Merck-Millipore, Burlington, Massachusetts, Estados Unidos).

11) Almacenamiento en oscuridad y a 4 °C.

Las incubaciones a partir del anticuerpo secundario (paso 6) se llevaron a cabo en oscuridad.

C.3 Protocolo para inmunofluorescencia sobre explantes de pared ventricular

1) Fijación en paraformaldehído al 4 % m/v en PB 0,1 M, pH 7,3 durante 24 h a 4 °C de temperatura.

2) 3 lavados de 10 min con PBS 0,01 M, pH 7,3.

3) Bloqueo mediante solución de uniones inespecíficas (ver Anexo A.3.1) durante 2 h a temperatura ambiente.

4) Incubación en anticuerpos primarios: anti- β IV-tubulina y anti-Foxj1, durante 72 h a 4 °C.

5) 3 lavados de 10 min con PBS 0,01 M, pH 7,3.

6) Incubación en anticuerpos secundarios: anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo, durante 1 h a temperatura ambiente.

7) 3 lavados de 10 min con PBS 0,01 M, pH 7,3.

8) Tinción nuclear con DAPI con solución para tinción de núcleos (ver Anexo A.3.3) durante 2 min a temperatura ambiente.

9) 3 lavados de 10 min con PBS 0,01 M, pH 7,3.

10) Montaje de las muestras con medio de montaje para explantes (18606-5, Polysciences Inc., Warrington, Pensilvania, Estados Unidos).

11) Almacenamiento en oscuridad y a 4 °C

Las incubaciones se llevaron a cabo en oscuridad.