

Daño cerebral traumático: fallo de la vía intravenosa para la administración de células madre estromales de médula ósea como tratamiento de las secuelas neurológicas crónicas

Traumatic brain injury: failure of the intravenous route for the administration of bone marrow stromal stem cells as treatment of chronic neurological sequels

Bonilla C, Otero L, Vela A, Zurita M, Rico M, Aguayo C, Rodríguez A, Vaquero J

Servicio de Neurocirugía, Unidad de Neurociencias y Cátedra FUNDACIÓN MAPFRE-UAM para Investigación en Daño Cerebral. Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Estudiar el posible efecto terapéutico de la administración intravenosa de células madre estromales (CME) obtenidas de médula ósea para tratar las secuelas neurológicas en fase crónica tras una lesión cerebral traumática.

Material y método: Se realizó un modelo de lesión cerebral traumática en ratas Wistar adultas y se estudió el déficit neurológico inducido en el curso de los dos meses siguientes, por medio del test mNSS y el test Smart. Tras ese tiempo, en fase de secuelas crónicamente establecidas, se administraron intravenosamente 15×10^6 CME (n:10) o suero fisiológico (n:10). En los dos meses siguientes se estudió la posible modificación de las secuelas neurológicas.

Resultados: Cuando se compararon los resultados de la valoración funcional entre ambos grupos experimentales, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Conclusión: Nuestros resultados sugieren que el trasplante de CME por vía intravenosa, en una fase de secuelas crónicamente establecidas tras una lesión traumática cerebral grave, no tiene efecto terapéutico.

Palabras clave:

Terapia celular, células madre adultas, daño cerebral traumático.

Abstract

Objective: We studied the possible therapeutic effect of intravenous administration (noninvasive method) of BMSCs to treat neurological sequels in a chronic stage after TBI.

Material and method: A model of TBI in adult Wistar rats was performed and we studied the neurological deficit induced in the course of two months, through the mNSS and Smart tests. After this time, with established sequels, 15×10^6 BMSCs (n = 10) or saline (n = 10) were administered intravenously. Changes in the neurological deficits were studied in two months.

Results: Comparison of functional changes between both experimental groups showed no statistically significant differences.

Conclusions: Our results suggest that transplantation of BMSCs intravenously, at a stage of established sequels after severe TBI, has no therapeutic effect.

Key words:

Cell therapy, adult stem cells, traumatic brain injury.

Correspondencia

J. Vaquero
Unidad de Investigación Neurociencias y Servicio de Neurocirugía
Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid.
Joaquín Rodrigo 2. 28222 Majadahonda, Madrid.
jvaquero@telefonica.net

Introducción

En la actualidad, el traumatismo craneoencefálico (TCE) como causa de daño cerebral es una de las principales causas de muerte e incapacidad en los países desarrollados. Además, representa un problema de salud pública ya que afecta principalmente a la población joven, siendo la principal causa de muerte en personas menores de 45 años de edad [1]. Actualmente no existe ningún tratamiento efectivo de sus secuelas neurológicas, exceptuando los resultados que pueden obtenerse por medio de la rehabilitación. Algo que complica enormemente el tratamiento de este tipo de lesiones cerebrales traumáticas es que son únicas en cada paciente y variables según la localización específica de la lesión en el cerebro [2].

En los últimos años existe un gran interés por el tema de las llamadas «células madre» y su posible potencial terapéutico para paliar determinadas enfermedades en el ser humano, entre las que se encuentran las lesiones traumáticas del Sistema Nervioso Central (SNC). La médula ósea adulta es una gran fuente de células madre mesenquimales (CMM) [3]. Entre ellas se ha prestado especial atención a las células madre del estroma (CME). Estas células pueden diferenciarse no solo hacia células de su misma línea germinal, como condroblastos, osteoblastos o mioblastos [4], sino que bajo determinadas condiciones pueden diferenciarse hacia células de una hoja embrionaria distinta, como células endoteliales o neuroectodérmicas [5-13]. Las CME son relativamente fáciles de obtener y pueden ser expandidas en cultivo bajo las condiciones apropiadas para la realización de trasplantes autólogos. Estas características aportan a las CME un gran potencial como agente terapéutico para el tratamiento de dichas lesiones traumáticas del SNC.

El propósito del presente trabajo es determinar si la eficacia demostrada de la administración intravenosa de CME en fase aguda, para revertir los déficit funcionales que aparecen tras una lesión cerebral traumática, puede ser extrapolada a lo que ocurre cuando las células se administran en una fase crónica, de secuelas neurológicas ya permanentes. La posibilidad de que confirmáramos un efecto terapéutico en estas condiciones experimentales aportaría muchas ventajas a la hora de trasladar estos protocolos de actuación a la clínica humana.

Material y métodos

Utilizamos 20 ratas Wistar hembras, de 200-250 g de peso, que fueron anestesiadas con isoflurano y sometidas posteriormente a una craneotomía de 10 mm de diámetro sobre el hueso parietal derecho del cráneo, entre las suturas lambda y bregma. Tras la exposición de la duramadre, se

procedió a abrir una ventana sobre la misma, con el fin de exponer la superficie cerebral. Se produjo una lesión cerebral traumática dejando caer, desde una altura de 15 cm, sobre la superficie del cerebro, una barra de 12 mm de diámetro y 25 g de peso. Esta barra fue guiada en su caída a través de un cilindro hueco, adaptado al área de la craneotomía, lo que permite realizar una lesión estandarizada que se define como el producto del peso de la barra por la altura desde la cual se deja esta caer. Con este modelo experimental, logramos producir una lesión cerebral grave. Tras la cirugía, las ratas fueron colocadas en una cámara con temperatura y humedad controladas, realizándose cuidados postoperatorios acordes con la situación clínica de las mismas y procedimientos diarios de vigilancia. En todos los animales se observaron signos característicos de un daño cerebral inmediatamente tras el impacto traumático y no mostraron recuperación funcional espontánea después de dos meses, momento en que se llevó a cabo el presente estudio.

Grupos experimentales

Para poder comprobar la posible utilidad del trasplante intravenoso de CME en el tratamiento del daño cerebral crónico se hicieron los siguientes grupos experimentales: Grupo A (n: 10), trasplante intravenoso de las CM resuspendidas en suero fisiológico (TCE+CM). Grupo B (n: 10), trasplante intravenoso simplemente de suero fisiológico (TCE+Suero). Transcurridos dos meses tras el TCE, todas las ratas fueron anestesiadas con isofluorano al 4% en N₂O:O₂ (70:30). La anestesia se mantuvo mediante isofluorano al 1-2% en N₂O:O₂ (70:30) y durante el procedimiento las ratas respiraban espontáneamente. Se procedió a cojer una vía periférica en la vena del rabo mediante un catéter de 24G. Una vez cateterizada la vía, los trasplantes se realizaron según el grupo experimental correspondiente. A diez ratas Wistar hembra adultas se les trasplantaron intravenosamente 15 x10⁶ CME resuspendidas en 1 mL de suero fisiológico, y otras diez ratas recibieron únicamente la administración intravenosa de 1 mL de suero fisiológico (controles).

Para llevar a cabo el seguimiento de la función motora y sensorial se realizaron dos pruebas diferentes, con el fin de detectar los posibles cambios en la función neurológica: mNSS, Escala de valoración sensitivo-motora, y Smart, Tiempo de permanencia de los animales dentro de un área concreta (una vez al día, tres días antes del TCE), con el fin de establecer los valores basales de los animales. Posteriormente se realizó un seguimiento semanal durante los dos meses que siguieron al desarrollo de la lesión cerebral. El

trasplante se realizó transcurridos esos dos primeros meses, y a partir de ese momento se volvió a realizar un seguimiento semanal, hasta cuatro meses tras el TCE (dos meses tras el trasplante o el tratamiento control). Se tomaron semanalmente los datos de la evolución de los animales tratados con CME (n: 10) y de los animales controles (n: 10), y se analizó la capacidad de detectar los cambios entre los dos grupos.

Obtención de CME de la médula ósea

Para la obtención de las CME se utilizaron ratas Wistar macho adultas entre 200 y 250 g de peso. Tras sacrificar los animales con una mezcla de 70% CO₂ y 30% O₂, se aislaron las tibias y los fémures, siendo inmediatamente colocados en medio alfa-MEM (Cambrex) / 2,5% suero fetal bovino (FBS, Lonza) suplementado con antibiótico (Lonza). Tras cortar las epífisis de los huesos en condiciones estériles (bajo campana de flujo laminar), se extrajo la médula ósea mediante lavado de los huesos con una jeringuilla y una aguja n° 26, cargada con 2 cc de medio alfa-MEM completo, es decir, suplementado con 2mM de L-glutamina (Lonza), 100u/ml penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 5 µg/ml de gentamicina (Lonza), sin deoxi-ribonucleótidos ni ribonucleótidos y con 20% FBS. Posteriormente, las células de la médula ósea fueron disgregadas mediante pipeteado y luego filtradas a través de una malla de nailon de 70 micras. La suspensión celular resultante fue sometida a recuento en cámara de Neubauer mediante el test de viabilidad del azul tripán. Tras el recuento, las células fueron subcultivadas en frascos de 75 cm² en una concentración 160.000 células/cm² en presencia de 12 cc de medio alfa-MEM completo/20%FBS, en una estufa a 37°C con 5% CO₂. A las 72 horas de incubación, el sobrenadante fue retirado y sustituido por medio nuevo. Cuando las células alcanzaron un desarrollo cercano a la confluencia, fueron levantadas del frasco de cultivo mediante su incubación con 3 ml de tripsina 0,25%/1mM EDTA (Lonza), durante 4-5 minutos, a 37° C. Tras este periodo de incubación, la tripsina fue inactivada con 6 mL de medio alfa-MEM completo/2,5% FBS. Las células obtenidas, tras ser centrifugadas a 1.200 rpm durante 15 minutos, fueron lavadas al menos dos veces con medio alfa-MEM completo / 2,5% FBS mediante centrifugación, a 1.000 rpm, durante cinco minutos cada lavado. Finalmente, el botón celular obtenido fue diluido en medio alfa-MEM completo/10%FBS y sometido a recuento nuevamente mediante el test de viabilidad de azul tripán. Tras el recuento, las células madre fueron subcultivadas en frascos de 75 cm², en una concentración 15.000 células/cm² en presencia de 12 mL de medio alfa-MEM completo / 10% FBS.

Preparación de los trasplantes celulares

Para obtener el material donante para el trasplante celular, células correspondientes a un primer pase (P1) se levantaron en condiciones estériles, bajo campana de flujo laminar por digestión enzimática con tripsina 0.25%/1 mM EDTA durante 4-5 minutos a 37° C. Tras este periodo de incubación, la tripsina fue inactivada con 6 ml de medio alfa-MEM completo/2,5% FBS. Las células obtenidas tras ser centrifugadas a 1.200 rpm durante 15 minutos, fueron lavadas con suero fisiológico y sometidas a recuento celular mediante el test de viabilidad del azul tripán. Una vez realizado el recuento, 15x10⁶ CME fueron nuevamente centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, el botón celular obtenido fue diluido en suero fisiológico al volumen requerido para el trasplante, aproximadamente 1 mL, y las células fueron cargadas en una jeringuilla para su posterior administración, en condiciones estériles y bajo campana de flujo laminar.

Valoración neurológica

La evaluación neurológica se realizó a través de los tests de mNSS y Smart. El test mNSS [14-16] cuenta con una serie de valoraciones que abarcan la función motora, la sensorial, el test de equilibrio de la viga (Tabla 1) y la medida de ausencia de reflejos. Consta de una puntuación máxima de 19 puntos, con las diferentes categorías según la puntuación obtenida: 1 a 4 puntos, lesión leve; 5 a 10 puntos, lesión moderada, y 11 a 19 puntos, lesión severa.

El Smart es un programa informático que nos ofrece la posibilidad de estudiar de una forma más objetiva las posibles mejoras en la función neurológica de los animales. Dicho programa analiza las imágenes que se recogen a través de una cámara que graba el interior de un cubil de 35 x 45 cm cerrado, donde se introdujeron a los animales de experimentación (Figura 1). Se determinaron una serie de pará-

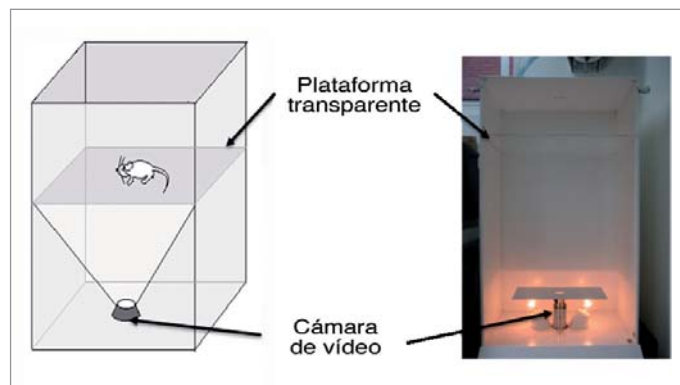


Fig. 1. Partes de la caja del Smart, un cubil cerrado donde se graba el movimiento de los animales.

Tabla 1. Escala de valoración sensitivo-motora.

Test	Prueba	Puntos
Test motor	Levantando la rata por el rabo	
	Flexión de los miembros traseros	1
	Flexión de los miembros delanteros	1
	El animal está rotado	1
	Situando la rata en el suelo	
	Camina normal	0
	Incapacidad para caminar recto	1
	Circular hacia el lado parético (derecho)	2
Test sensorial	Test de orientación (visual y táctil)	1
	Test propioceptivo (sensibilidad profunda)	1
Test equilibrio en viga	Mantener el equilibrio con postura firme	0
	Agarrarse al costado de la viga	1
	Abrazado a la viga y 1 de los miembros cae de la viga	2
	Abrazado a la viga y 2 de los miembros caen de la viga, o gira en la viga (>60 segundos)	3
	Conseguir el equilibrio en la viga pero cae fuera (>40 segundos)	4
	Conseguir el equilibrio en la viga pero cae fuera (>20 segundos)	5
	Caer fuera; no consigue el equilibrio o queda colgado de la viga (<20 segundos)	6
Ausencia de reflejos	Reflejo pinna (Sacudida de cabeza cuando tocamos o estimulamos el pabellón auditivo)	1
	Reflejo corneal (Parpadeo del ojo cuando lo rozamos con un algodón)	1
	Reflejo susto (Respuesta motora cuando hacemos ruido con las palmas de las manos)	1
	Inmovilidad y mirada fija	1
	Temblor (Sacudida de perro mojado)	1
	Irritabilidad, crisis epilépticas, clonus y mioclonos (espasticidad)	1
Puntuación máxima		19

metros para estandarizar las medidas. Se tomaron los valores durante 1,5 minutos y la velocidad máxima se fijó a los 10 cm/s. Se definieron una serie de áreas con el fin de establecer las diferencias en el movimiento y la orientación, las cuales se agruparon en dos zonas, zona interior y zona exterior del campo donde se encontraban. Los animales sanos se mueven preferentemente por la zona exterior, mientras que los animales lesionados lo hacen indistintamente por ambas zonas. Se analiza el tiempo que los animales permanecen en la zona interior (Tiempo de permanencia en zona interior).

Estudios histológicos

Transcurridos los cuatro meses tras la lesión cerebral y tras sacrificar los animales, se estudiaron, en tres de cada grupo, los aspectos macroscópicos e histológicos de la zona cerebral donde se había hecho la lesión y la administración de CME o suero fisiológico. La técnica histológica utilizada fue la de hematoxilina-eosina. A los dos meses de recibir el tratamiento correspondiente a cada grupo (cuatro meses

después del TCE), las ratas fueron anestesiadas con sevoflurano al 4% en un flujo de oxígeno de 3 L/min y eutanasiadas intracardialmente con 1 mL de cloruro potásico. Se procedió a la obtención de diferentes muestras de tejido para la realización de posibles estudios posteriores histológicos y macroscópicos. Se extrajeron los cerebros de todos los animales de experimentación (correspondientes a los dos grupos de estudio). Una vez extraídos los cerebros, fueron fijados en paraformaldehído 4% en una solución de buffer fosfato (PBS 1X, pH 7,4), durante 12 horas a 4° C. Una vez transcurrido el tiempo, se analizaron macroscópicamente todos los cerebros para determinar posibles cambios asociados a los tratamientos, como disminución del tamaño de lesión. Posteriormente, los cerebros fueron procesados siguiendo las técnicas convencionales histológicas de inclusión en parafina. Para ello se dividieron sagitalmente por la mitad, de modo que el hemisferio lesionado y el contralateral quedaron separados. Tras ser lavados y deshidratados por una serie creciente de alcoholes, se sumergieron en

parafina a 55° C, 24 horas. Pasado el tiempo se formaron dos bloques de tejido por cerebro (uno por hemisferio), los cuales fueron procesados a través de un microtomo convencional de forma seriada en cortes de 5 µm. Cada 10 cortes histológicos se realizó una hematoxilina-eosina, como tinción control del tejido para determinar posibles diferencias histológicas dependiendo del tratamiento administrado.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos con las diferentes escalas de valoración se analizaron estadísticamente a través del soporte informático SPSS (versión 15.0), donde se realizó una valoración de t de Student para la comparación de medias de muestras relacionadas (n: 20). Se analizaron los grupos de datos correspondientes a los dos tratamientos: por un lado, el grupo tratado con suero (n: 10) y, por otro, el grupo tratado con CME (n: 10), en las semanas 2, 4, 6 y 8 post-trasplante, con el fin de poder detectar los efectos que se producen como consecuencia del mismo.

Resultados

Valoración neurológica

Tras el TCE se detecta un déficit evidente en todos los animales. Se obtuvieron resultados de los dos métodos de valoración que se realizaron durante el transcurso de meses desde la lesión cerebral.

Al representar los valores obtenidos con la Escala de valoración sensitivo-motora (Figura 2), se puede observar que la evolución de los animales tratados con CME intravenosamente y los controles es similar, no percibiéndose diferencias entre ambos grupos. Cuando se analiza la evolución, se

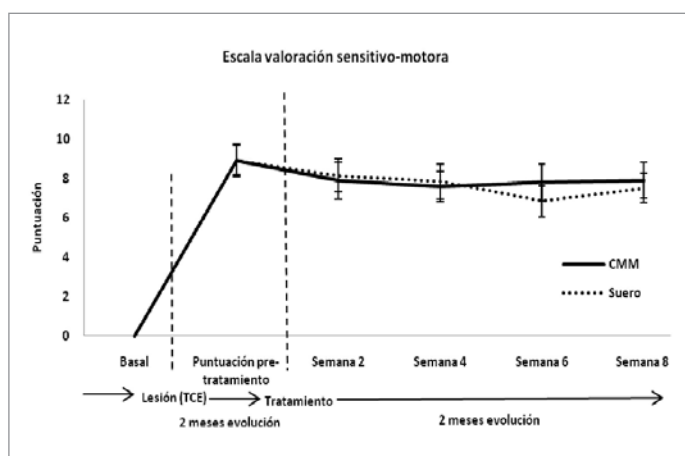


Fig. 2. Evolución funcional a través de la escala sensitivo-motora del grupo tratado (CME) respecto del grupo control (Suero).

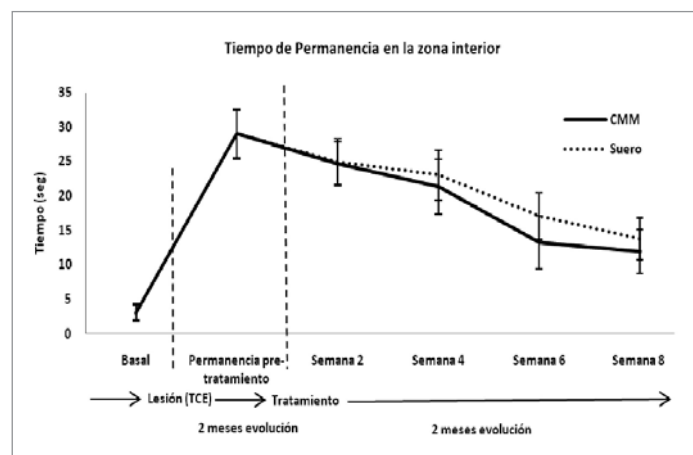


Fig. 3. Tiempo en el que los animales permanecen en la zona interior del cubículo del grupo tratado (CME) respecto del grupo control (Suero).

observa que la recuperación no fue estadísticamente significativa al comparar ambos grupos en ninguno de los puntos del estudio ($p \geq 0.05$).

Smart

Se analizaron las imágenes captadas a través del Smart (Figura 1) y, en concreto, se estudió el «tiempo de permanencia» de los animales en la zona interior del cubículo. Se observó que la evolución de los animales tratados con células fue muy similar a la evolución de los animales controles. Al comparar estadísticamente el tiempo que los animales permanecen en el interior del cubículo durante todos los puntos del estudio (Figura 2), no se detectaron diferencias significativas entre los animales tratados con CME y los animales tratados con suero ($p \geq 0.05$).

Estudio macroscópico

Se analizaron todos los cerebros macroscópicamente con el fin de detectar posibles diferencias en el tamaño de la lesión. No se advirtieron diferencias en los tamaños de lesión entre los dos grupos experimentales (animales tratados con CME y animales tratados con suero) (Figura 3).

Descripción histológica

Al finalizar el modelo se realizaron estudios histológicos utilizando las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina de la zona de lesión. No se detectaron cambios en el volumen de la misma al comparar el grupo trasplantado intravenosamente con CME con el grupo tratado con suero fisiológico.

Todos los animales mostraron en la zona de la lesión las típicas alteraciones asociadas a un daño cerebral traumático.

co grave, con la presencia de una gran cavidad necrótica, parcialmente invadida por macrófagos, células inflamatorias y algunos astrocitos reactivos. Las ratas pertenecientes al grupo tratado intravenosamente con CME no mostraron diferencias histológicas, dentro de la zona de lesión, respecto de los animales controles (Figura 4).

Discusión

El trasplante de CME de la medula ósea puede recuperar los déficit funcionales que tienen lugar tras una lesión traumática de la médula espinal [17-19] o un daño cerebral en roedores [20]. También parece que las CME migran por el cerebro y se diferencian en neuronas y células gliales [19-22]. Varios factores, como la transdiferenciación, la inducción de la neurogénesis y la angiogénesis, la neuroprotección y la activación de los procesos neurorestaurativos endógenos, pueden formar parte de los beneficios que se relacionan con la administración de CME.

Se han realizado multitud de estudios tratando de discriminar cuál es el mejor momento y forma de administrar las células dentro de la primera semana, es decir, durante la fase aguda, tras producirse el trauma cerebral, para así optimizar al máximo el potencial terapéutico de las células trasplantadas. La mayoría de los estudios experimentales de terapia celular en TBI se han realizado utilizando inyecciones intravenosas de CME en fases agudas tras la lesión traumática (CME murinas y humanas), generalmente en un periodo de tiempo entre las 24 horas y 7 días que siguen al traumatismo, aparentemente con buenos resultados [14][22-26].

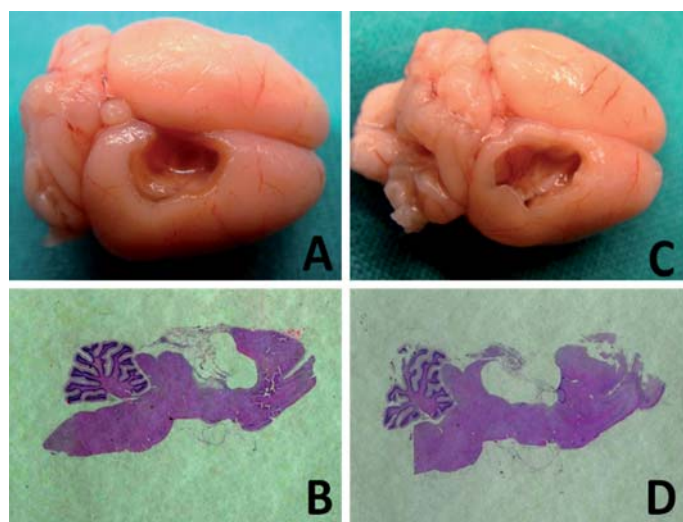


Fig. 4. Estudio macroscópico e histológico de las muestras de cerebro de los animales tratados intravenosamente con CME (A y B) y de los controles (C y D).

Con la administración intravenosa se ha observado recuperación funcional al menos hasta tres meses después de realizar los tratamientos. Las células se distribuyen por todo el cuerpo, localizándose algunas en la zona de lesión, y de ellas un porcentaje pequeño muestra fenotipos de células neurales o gliales [24][27]. Sin embargo, todavía quedan muchas variables que determinar para establecer todo el potencial que nos ofrecen estas células, como la dosis celular óptima, el momento de realización del tratamiento o la mejor vía de administración.

Pese a que los primeros ensayos con trasplantes autólogos de estas células en pacientes parecen ofrecer resultados prometedores [28], no cabe duda de que aún queda mucho para llegar a establecer los parámetros óptimos de administración y para sacar el mayor partido a las terapias celulares con CME.

Aunque la aplicación de técnicas de terapia celular con células madre adultas para tratar lesiones del Sistema Nervioso está aún en sus comienzos, existen indicios que sugieren su eficacia en el tratamiento del daño cerebral adquirido y en la literatura existen ya numerosas evidencias experimentales acerca de la utilidad del trasplante intravenoso de CME de la medula ósea dentro de los primeros días tras una lesión cerebral traumática [23-27][29][30], señalándose entre las ventajas de esta forma de tratamiento que es un método poco invasivo y fácilmente reproducible. Estas experiencias, sin embargo, no han sido confirmadas por otros grupos [31].

En nuestro laboratorio hemos demostrado recientemente la utilidad del trasplante intralesional de CME, en una fase tardía tras el TCE, para mejorar las secuelas neurológicas establecidas [21]. Esta técnica requiere una cirugía invasiva, y por esta razón, nuestro presente estudio fue realizado para comprobar si también existe eficacia terapéutica del trasplante de CME, cuando se utiliza la vía intravenosa en lugar de la administración local intracerebral.

El modelo de TCE desarrollado en el presente trabajo causa pérdida de tejido cerebral y deficiencias motoras graves, que son evidentes en todos los animales inmediatamente después de sufrir el trauma. Nos planteamos medir los posibles cambios neurológicos asociados a la administración intravenosa de CME por medio de dos pruebas de valoración de la función neurológica. Con dichas pruebas podemos ver que la terapia intravenosa con CME, dos meses después de la lesión cerebral grave, no tiene ningún tipo de efecto sobre la respuesta motora y sensorial de los animales tratados, y que además esta se corresponde con la respuesta de un animal al que solo se le ha administrado suero fisiológico y que se deja evolucionar el mismo periodo de tiempo.

po. En el presente estudio, y de acuerdo con los objetivos planteados, no se consideró necesario tratar de identificar la supervivencia o diferenciación de las células trasplantadas, puesto que no se obtuvo ningún tipo de evidencia a favor de la eficacia de la administración intravenosa de CME para tratar las secuelas establecidas de un daño cerebral, ni tampoco ninguna diferencia macroscópica o microscópica de los cerebros analizados.

Prácticamente no hay evidencias de la capacidad beneficiosa de las células madre en fases más avanzadas de la lesión cerebral. En un estudio [32] se trasplantaron CME de la médula ósea intravenosamente en animales a los que un mes antes se les había producido una isquemia cerebral por oclusión de la arteria cerebral media. Se siguió la evolución de los animales durante 12 semanas, y se apreciaron mejorías sensoriales y motoras estadísticamente significativas en el test mNSS. Dichas observaciones apoyan los resultados previamente descritos por algunos autores en los que la administración intravenosa de CME, en fases precoces tras un TCE, disminuye los déficit funcionales respecto de animales control [17][24][27][33]. Quienes defienden esta estrategia terapéutica señalan que la administración intravenosa abarca un área mayor [24][25], lo que ayudaría a potenciar el efecto beneficioso de las células trasplantadas y su colonización intracerebral. En estos estudios se ha comprobado que la administración intravenosa de CME en una fase aguda tras el TCE promueve su integración en el cerebro de la rata, las células sobreviven y migran al área de lesión, aunque muy pocas de ellas llegan a adquirir fenotipos neurales, posiblemente porque la mayoría quedan retenidas en órganos de alta perfusión. Por otro lado, se ha visto que CME trasplantadas directamente en el parénquima del cerebro de ratas con TCE migran y expresan marcadores neuronales y gliales e inducen mejoras funcionales y neurológicas [34], aunque el número de células que sobreviven es muy bajo.

En estudios previos realizados por nuestro grupo, hemos comprobado que las CME administradas intracerebralmente, dos meses después del TCE, mejoran la función motora y sensorial de los animales trasplantados. Además, las CME trasplantadas sobreviven y tienen capacidad tanto para diferenciarse de elementos neurales como para activar la neurogénesis endógena [21]. Cabría preguntarse si este efecto se continúa en el tiempo, para lo que se hace necesario estudiar los efectos en fases más tardías, posiblemente al año de evolución de los animales.

Los resultados obtenidos en nuestro presente estudio muestran que la administración de CME por vía sistémica, en una fase crónica tras el daño cerebral traumático,

no tiene eficacia terapéutica, lo que puede ser explicado por las diferencias que existen en el cerebro sometido a una lesión traumática según los tiempos de evolución del daño cerebral. Durante los primeros días tras la lesión traumática hay rotura de la barrera hemato-encefálica, y por ello la colonización cerebral de las CME administradas puede resultar mucho más fácil que en fases tardías, de lesión crónicamente establecida, y cuando en el cerebro lesionado han desaparecido una serie de factores locales que generalmente se asocian a la fase aguda lesional. Dos meses después del trauma cerebral, la barrera hemato-encefálica se ha restablecido y las células encuentran una mayor dificultad para alcanzar la zona cerebral lesionada si son administradas por vía sistémica, lo que está de acuerdo con estudios previos de nuestro laboratorio, que demuestran tanto la tendencia de las CME a colonizar órganos de perfusión tras su administración sistémica [35], como la clara superioridad de esta forma de terapia celular si se administra localmente frente a la administración intravenosa [36]. Como conclusión del presente estudio, nuestros hallazgos sugieren la ineficacia de la terapia celular con CME si las células se administran por vía intravenosa en una fase tardía tras un daño cerebral traumático. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J Head Trauma Rehabil* 2006; 21:375-8.
2. Prieto R, Gutiérrez-González R, Pascual JM, Roda JM, Cerdán S, Matías-Guiu J, Barcia JA. Modelos experimentales de traumatismo craneoencefálico. *Neurocirugía* 2009; 20:225-44.
3. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4:267-74.
4. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissue. *Science* 1997; 276:71-4.
5. Benayahu D, Akavia UD, Shur I. Differentiation of bone marrow stroma-derived mesenchymal cells. *Curr Med Chem* 2007; 14:173-9.
6. Dewaza M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, *et al.* Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 2004; 113 :1701-10.
7. Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, Ohgushi H. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: prepa-

- ration and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs* 2004; 28:33-9.
8. Parr AM, Tator CH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transpl* 2007; 40:609-19.
 9. Sánchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Peláez F, Stedeford T, Willing A, Freemant B, *et al.* Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000; 164:247-56.
 10. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate to neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61:264-70.
 11. Zurita M, Aguayo C, Oya S, Vaquero J. Implicación de factores neurotróficos en la transdiferenciación neuronal de células madre mesenquimales adultas. *Mapfre Medicina* 2007; 18:201-8.
 12. Zurita M, Vaquero J, Oya S, Bonilla C, Aguayo C. Neurotrophic Schwann-cell factors induce neural differentiation of bone marrow stromal cells. *Neuroreport* 2007; 18:1713-7.
 13. Zurita M, Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Vaquero J. Neural transdifferentiation of bone marrow stromal cells obtained by chemical agents is a short-time reversible phenomenon. *Neurosci Res* 2008; 60:275-80.
 14. Chen J, Li Y, Wang L, Zhang X, Lu D, Lu M, Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2001; 32:1005-11.
 15. Lu D, Mahmood A, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport* 2001; 12:559-63.
 16. Mahmood A, Lu D, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. *Neurosurgery*. 2001; 49:1196-203.
 17. Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol* 2002; 1:92-100.
 18. Ankeny DP, Mc Tighe DM, Jakeman LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 2004; 190:17-31.
 19. Zurita M, Vaquero J, Bonilla C, Santos M, De Haro J, Oya S, Aguayo C. Functional recovery of chronic paraplegic pigs after autologous transplantation of bone marrow stromal cells. *Transplantation* 2008; 86:845-53.
 20. Li Y, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 2009; 456:120-3.
 21. Bonilla C, Zurita M, Otero L, Aguayo C, Vaquero J. Delayed intralesional transplantation of bone marrow stromal cells increases endogenous neurogenesis and promotes functional recovery after severe traumatic brain injury. *Brain Inj* 2009; 23:760-9.
 22. Qu C, Mahmood A, Lu D, Goussev A, Xiong Y, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in mice with marrow stromal cells. *Brain Res* 2008; 1208:234-9.
 23. Lu D, Mahmood A, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport* 2001; 12:559-63.
 24. Mahmood A, Lu D, Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2004; 21:33-9.
 25. Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* 2003; 53:697-702.
 26. Mahmood A, Lu D, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. *Neurosurgery*. 2001; 49:1196-203.
 27. Lu J, Moochhala S, Moore XL, Ng KC, Tan MH, Lee LK, *et al.* Adult bone marrow cells differentiate into neural phenotypes and improve functional recovery in rats following traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 2006; 398:12-7.
 28. Zhang ZX, Guan LX, Zhang K, Zhang Q, Dai LJ. A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stromal cells to patients with traumatic brain injury. *Cytototherapy* 2008; 10:134-9.
 29. Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Chopp M. Human marrow stromal cell treatment provides long-lasting benefit after traumatic brain injury in rats. *Neurosurgery* 2005; 57:1026-31.
 30. Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Chopp M. Long-term recovery after bone marrow stromal cell treatment of traumatic brain injury in rats. *J Neurosurg* 2006; 104:272-7.
 31. Harting MT, Jiménez F, Xue H, Fischer UM, Baumgartner J, Dash PK, *et al.* Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2009; 110:1189-97.
 32. Shen LH, Li Y, Chen J, Zacharek A, Gao Q, Kapke A, *et al.* Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007; 27:6-13.
 33. Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury with a combination therapy

- of marrow stromal cells and atorvastatin in rats. *Neurosurg* 2007; 60:546-53.
34. Mahmood A, Lu D, Wang L, Chopp M. Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2002; 19:1609-17.
35. De Haro J, Zurita, Ayllón L, Vaquero J. Detection of ¹¹¹In-oxine-labeled bone marrow stromal cells after intravenous or intralesional administration in chronic paraplegic rats. *Neurosci Lett* 2005; 377:7-11.
36. Vaquero J, Zurita M, Oya S, Santos M. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration? *Neurosci Lett* 2006; 398:129-34.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este trabajo. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.