

Discapacidad grave tras daño cerebral traumático: posibilidades terapéuticas de la administración subaracnoidea de células estromales

Severe disability after traumatic brain injury: therapeutic possibilities of subarachnoid administration of stromal cells

Bonilla C, Zurita M, Otero L, Aguayo C, Rodríguez A, Rico MA

Unidad de Investigación Neurociencias, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, España.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Estudiar el efecto terapéutico de la administración de células madre mesenquimales (CMM) para tratar secuelas neurológicas crónicas producidas tras una lesión cerebral.

Material y método: En 20 ratas Wistar adultas y dos meses después de una lesión cerebral traumática, se realizó la administración subaracnoidea de CMM o suero. Se valoró la respuesta funcional de los animales y se hizo un análisis histológico del tejido cerebral.

Resultados: No se obtuvieron mejoras significativas en la respuesta funcional de animales con CMM. Se localizaron CMM dentro del tejido cerebral, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de la lesión pero no en la expresión de marcadores neurales.

Conclusión: El tratamiento subaracnoideo con CMM no tiene efecto en la respuesta neurológica de animales lesionados, aunque las células migraron y se integraron en el tejido cerebral, afectando a la morfología del mismo.

Palabras clave:

Trasplante subaracnoideo, lesión traumática cerebral, células madre mesenquimales.

Abstract

Objective: To study the therapeutic effect of administration of mesenchymal stem cells (MSCs) to treat chronic neurological sequelae produced after traumatic brain injury (TBI).

Material and method: In 20 adult Wistar rats and two months after TBI, subarachnoid administration of CMM or saline were performed. Functional response of the animals was assessed and a histological analysis of brain tissue was conducted.

Results: There was no significant improvement in the functional response in animals with MSCs. MSCs were located within the brain tissue obtained statistically significant difference in lesion size but not in the expression of neural markers.

Conclusion: Subarachnoid treatment with MSCs has no effect on neurological response of injured animals, although the cells migrated and integrated into the brain tissue affecting their morphology.

Key-words:

Subarachnoid transplant, traumatic brain injury, mesenchymal stem cells.

Correspondencia

MA Rico

Unidad de Investigación Neurociencias, Hospital Universitario Puerta de Hierro,
Joaquín Rodrigo, 2. 28222 Majadahonda, Madrid, España.
e-mail: miguelangel.rico@salud.madrid.org

I Introducción

En la actualidad, el traumatismo craneoencefálico (TCE) es una de las principales causas de muerte e incapacidad en los países desarrollados. Además, representa un gran 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 para el daño cerebral traumático, exceptuando tratamientos paliativos o la evacuación quirúrgica en algunos casos, así como los escasos resultados que pueden obtenerse por medio de la rehabilitación. Algo que complica enormemente el tratamiento de este tipo de lesiones es que son únicas en cada paciente, influyendo tanto los factores desencadenantes como la gravedad y la localización específica de la lesión en el cerebro [2].

Las terapias celulares con CMM son capaces de inducir todos los procesos esenciales relacionados con la recuperación de las funciones neurológicas perdidas tras un daño sobre el sistema nervioso central. La médula ósea adulta es una gran fuente de CMM [3]. Se sabe que 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 CMM 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 CMM un gran potencial como agente terapéutico para el tratamiento de lesiones traumáticas cerebrales.

Hay evidencias de que el trasplante de células madre mesenquimales de la médula ósea puede recuperar los déficits funcionales que tienen lugar tras una lesión traumática de la médula espinal [14-17] o un daño cerebral en roedores [18]. También existen evidencias a favor de que las CMM migren por el cerebro y se diferencian en neuronas y células gliales [17-20]. Varios factores como la transdiferenciación, inducción de la neurogénesis y angiogénesis, neuroprotección y activación de los procesos neurorestaurativos endógenos parecen formar parte de los beneficios que se relacionan con la administración de CMM.

Se han realizado multitud de estudios tratando de discriminar cuál es el mejor momento y forma de administrar las células durante la fase aguda tras producirse el trauma cerebral, para así optimizar al máximo el potencial terapéutico de las células trasplantadas. La inyección subaracnoidea a través de una punción lumbar es una estrategia muy prometedora por tratarse de una técnica mínimamente invasiva, simple y con un bajo coste [21, 22]. Existen evidencias a

favor de que las CMM administradas intratecalmente en un modelo de lesión cerebral traumática tienen efectos beneficiosos superiores a la administración intravenosa de las mismas cuando el tratamiento se realiza 24 horas tras la lesión [23]. Sin embargo, no existen evidencias experimentales del efecto terapéutico de estas células cuando se administran en lesiones cerebrales crónicas.

El propósito del presente trabajo es determinar si la eficacia demostrada de la administración subaracnoidea de CMM en fase aguda para revertir los déficits funcionales que aparecen tras una lesión cerebral traumática puede ser igual de eficaz en el tratamiento en fase crónica de una lesión cerebral, lo cual aportaría muchas ventajas a la hora de trasladar estos protocolos de actuación a la clínica humana.

I Material y métodos

Se usaron 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 se guió en su caída a través de un cilindro hueco, adaptado al área de la craneotomía, lo que permitió realizar una lesión estandarizada que se define como el producto del peso de la barra por la altura desde la cual se deja caer. Tras la realización de la lesión cerebral, se dejaron evolucionar los animales dos meses antes de someterlos a tratamiento.

Para el estudio se realizaron los siguientes grupos experimentales:

- Grupo A (n=10): trasplante subaracnoideo de 2×10^6 CMM resuspendidas en 100 μ L de suero fisiológico.
- Grupo B (n=10): trasplante subaracnoideo de 100 μ L de suero fisiológico.

Para la obtención de las CMM se usaron ratas Wistar macho adultas de 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, la médula ósea se extrajo mediante lavado de los huesos con una jeringuilla y una aguja nº 26, cargada con 2 cc de medio alfa-MEM completo suplementado con 20% FBS, 2mM de L-glutamina (Lonza), 100u/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomycinina y 5 μ g/ml de gentamicina (Lonza). Posteriormente, las células

de la médula ósea se disgregaron mediante pipeteado suave y luego se filtraron a través de una malla de nylon de 70 μm . La suspensión celular resultante se contó en cámara de Neubauer mediante el test de viabilidad del azul tripán. Tras el recuento, las células obtenidas se cultivaron en frascos de 75 cm^2 en una concentración 160.000 células/ cm^2 en presencia de 12 cc de medio alfa-MEM completo (20%FBS), en una estufa a 37° C con 5% CO_2 . A las 72 horas de incubación el sobrenadante se substituyó por medio nuevo. Cuando las células adheridas al frasco alcanzaron una expansión cercana a la confluencia, se levantaron 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 se inactivó con 6 mL de medio alfa-MEM completo (2,5% FBS). Las células obtenidas, tras ser centrifugadas, a 1.200 rpm, durante 15 minutos, se lavaron al menos dos veces con medio alfa-MEM completo (2,5% FBS) mediante centrifugación, a 1.000 rpm, durante 5 minutos cada lavado. Finalmente, el botón celular obtenido se diluyó en medio alfa-MEM completo (10% FBS) y se contó nuevamente mediante el test de viabilidad de azul tripán. Tras el recuento, las células madre se subcultivaron en frascos de 75 cm^2 , en una concentración 15.000 células/ cm^2 en presencia de 12mL de medio alfa- MEM completo (10% FBS).

Para obtener las CMM para el día del tratamiento, las células correspondientes se levantaron, en condiciones estériles, por digestión enzimática con tripsina 0.25%/1mM EDTA durante 4-5 minutos a 37°C. Tras este periodo de incubación la tripsina se inactivó con 6 ml de medio alfa-MEM completo (2,5% FBS). Las células obtenidas tras ser centrifugadas, a 1.200 rpm, durante 15 minutos se lavaron con suero fisiológico y se contaron mediante el test de viabilidad del azul tripán. Una vez realizado el recuento, se repartieron las células en alícuotas de 2×10^6 CMM y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, el botón celular obtenido se diluyó en suero fisiológico al volumen requerido para el trasplante, aproximadamente 100 μL .

Para el realizar el tratamiento de los animales lesionados solo se usaron CMM sometidas como mucho a dos pases de cultivo (pase 2), con una viabilidad nunca inferior al 90% y cuya identidad fenotípica realizada por citometría de flujo cumpliera los criterios relacionados con células mesenquimales (ver siguiente apartado).

Antes del trasplante de las CMM, se realizó un ensayo para comprobar la identidad fenotípica celular por citometría de flujo. Para este ensayo se usaron una serie de anticuerpos conjugados con los fluorocromos fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) o alexa-fluor 647 (AL647). Los anticuerpos usados, todos específicos para rata, fueron: CD11b, CD29,

CD31, CD45 y CD90 (AbD Serotec). Además, se incluyeron los controles isotípicos apropiados en cada experimento. Para el marcaje las células se resuspendieron a una concentración de 10^6 cells/mL en PBS y se incubaron en presencia de los anticuerpos (dilución 1/10 v/v) durante 15 minutos a 4 ° C. Posteriormente, las células se lavaron añadiendo 1 mL de PBS y se centrifugaron 7 minutos a 4° C. Por último, y tras descartar el sobrenadante, el botón celular se resuspendió en 500 μL de PBS. En este paso se añadieron a todos los tubos 3 μL de Ioduro de propidio (PI, Southernbiotech) como marcador de viabilidad para descartar las células muertas del ensayo. Las células se adquirieron en un citómetro de flujo Cytomics FC500 MPL y posteriormente se analizaron para la expresión de los marcadores anteriormente descritos. En este análisis, $\geq 95\%$ de las células debían expresar los marcadores CD29 y CD90, y que la expresión de los marcadores CD11b, CD45 y CD31 fuera $\leq 5\%$ para ser consideradas como CMM aptas para el tratamiento.

Administración subaracnoidea

Transcurridos dos meses tras el TCE, todas las ratas se anestesiaron con isofluorane al 4% en $\text{N}_2\text{O}:\text{O}_2$ (70:30). La anestesia se mantuvo mediante isofluorane al 1-2% en $\text{N}_2\text{O}:\text{O}_2$ (70:30) y durante el procedimiento se comprobó que las ratas respiraban espontáneamente. Tras ser sometidas a una laminectomía a la altura de T6-T8, y una vez expuesta la duramadre, se procedió a introducir un catéter de 28G por debajo de la duramadre para realizar los tratamientos según el grupo experimental correspondiente.

Valoración de la función motora y sensorial

El seguimiento de la función motora y sensorial se realizó mediante dos pruebas diferentes: mNSS, que es una escala de valoración sensitivo-motora, y Smart, que es una escala que mide el tiempo de permanencia de los animales en un área concreta. Estas escalas se hicieron 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 siguientes al desarrollo de la lesión cerebral. El trasplante se llevó a cabo transcurridos esos dos primeros meses. A partir de ese momento se realizó un seguimiento semanal, hasta cuatro meses tras el TCE (dos meses tras el trasplante), para recoger datos de la evolución de los animales tratados con CMM y de los animales control para analizar los posibles cambios entre los dos grupos.

Estudios histológicos

Transcurridos cuatro meses tras la lesión cerebral, se estudiaron, en tres animales de cada grupo, los aspectos macros-

cópicos e histológicos de la zona cerebral donde se había llevado a cabo el trasplante. Para ello, a los dos meses de recibir el tratamiento correspondiente a cada grupo (cuatro meses después del TCE), las ratas fueron anestesiadas con sevoflurane al 4% en un flujo de oxígeno de 3 l/min y eutanasiadas intracardialmente con 1 mL de cloruro potásico. Se extrajeron los cerebros de todos los animales de experimentación (correspondientes a los dos grupos de estudio). Una vez extraídas las muestras, se fijaron con paraformaldehído 4% en una solución de *buffer* fosfato (PBS 1X, pH 7,4) durante 12 horas a 4° C. Posteriormente se analizaron macroscópicamente todos los cerebros con el fin de determinar posibles cambios en el volumen de lesión asociados al tratamiento. Por último, las muestras se procesaron siguiendo las técnicas convencionales histológicas de inclusión en parafina y fueron cortadas con un microtomo convencional de forma seriada en cortes de 5 µm. Cada 10 cortes histológicos se realizó una tinción de hematoxilina-eosina, como control del tejido para determinar posibles diferencias histológicas dependiendo del tratamiento administrado.

La caracterización inmunohistoquímica de la zona de la lesión se realizó mediante la utilización de diferentes marcadores celulares: MAP-2 (proteína 2 asociada a microtúbulo): marcador de neuronas maduras (1 µg/ml, Chemicon International Inc, Temecula, CA, EE. UU.); PGFA (proteína gliofibrilar ácida): marcador de astrocitos (1 µg/ml, LabVision Westinghouse, Dr Fremont, CA, EE.UU.); nestina: marcador de progenitores neurales (1:100, Chemicon), y Ki-67: marcador nuclear de células en proliferación (1:200, LabVision).

Cinco cortes separados entre sí 20 µm de cada bloque de parafina fueron desparafinados en xilol seguido por una serie de crecientemente de alcoholes hasta agua. Una vez lavadas las secciones con PBS, se trataron con un *buffer* citrato salino (pH = 6) llevado a ebullición en un microondas durante 10 minutos. Después de enfriarse a temperatura ambiente, los cortes se trataron con 3% H₂O₂ durante 30 minutos para inactivar la actividad de la peroxidasa endógena. Antes de la incubación con el anticuerpo primario, los lugares de unión no-específicos fueron bloqueados durante una hora con suero normal 3% correspondiente a la especie en la que el anticuerpo secundario es generado. El anticuerpo primario se añadió directamente tras lavar el exceso de suero bloqueante y se incubó toda la noche a 4° C. Tras lavar el anticuerpo primario con PBS, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario anti-*mouse* o anti-*rabbit* conjugado con biotina (5 µg/ml, Vector Inc, CA, EE.UU.). Finalmente, el anticuerpo secundario conjugado con biotina se lavó con PBS y se reveló utilizando la técnica ABC, para estudio con microscopía de luz convencional. En cada serie se efectuaron controles del anticuerpo primario y del secundario,

los cuales consistieron en realizar la técnica completa sustituyendo el anticuerpo primario o el secundario por PBS.

Hibridación *in situ* para la detección del gen Sry del cromosoma Y

Con el fin de localizar las CMM trasplantadas procedentes de las ratas macho donantes en la zona de lesión de las ratas hembra receptoras, se usó la técnica de hibridación *in situ* con una sonda de DNA marcada en su extremo 5' con biotina, contra la región Sry del cromosoma Y murino. Esta región permite la determinación del sexo en los roedores.

Para ello, secciones procedentes del área de trasplante se desparafinaron y deshidrataron con xilol y una serie gradual de alcoholes. Posteriormente, las muestras se digirieron con proteinasa K (30 µg/ml) durante 15 minutos a 37 ° C. La hibridación se realizó incubando la muestra a 50 °C toda la noche con un *mix* de hibridación que contenía: 2% DNA de Salmon Test, 10% Dextrán sulfato, 10% 50X solución Denhardt's, 400 ng de sonda biotinilada con una secuencia específica contra el gen murino Sry, que se encuentra en una región que codifica proteínas encargadas de los caracteres secundarios sexuales masculinos dentro del cromosoma Y.

La sonda biotinilada se visualizó a través de una inmunofluorescencia, usando un anticuerpo primario anti-biotina *mouse* IgG (1:100, Jackson) y un anticuerpo secundario conjugado con Rhodamine (TRICT anti-*mouse* IgG (1:200, Jackson). Los cortes fueron incubados con 4' 6-diamidino-2-phenylindole dichlorhydrate (DAPI)(Merck) y montados con glicerol. Se realizaron controles negativos donde la sonda no se añadió al *mix* de hibridación y controles positivos donde la hibridación se realizó sobre cerebros de ratas macho.

Estudios estadísticos

Los datos se analizaron mediante técnicas estadísticas como el test de análisis de varianza al objeto de comparar datos de valoración funcional y hallazgos histológicos. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos datos que presentaron una p<0.05. Se usó como método de ayuda el programa de análisis estadístico SPSS.

I Resultados

Con el objeto de estudiar la terapia con CMM en TCE, previamente se puso a punto un modelo de lesión cerebral traumática en rata Wistar, consiguiendo producir en estos animales una lesión cerebral que deriva en déficits neurológicos crónicos medibles y cuantificables a los dos meses de evolución del daño cerebral. Además, este modelo provoca secuelas macroscópicas sobre el tejido cerebral, lo que permite estudiar la influencia de la terapia celular sobre el mismo.

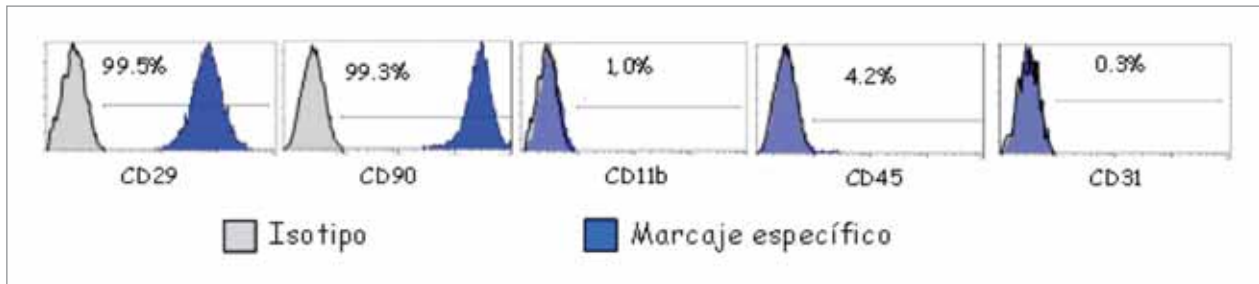


Fig. 1. Caracterización fenotípica de las CMM de rata. Las CMM se marcaron con los anticuerpos CD11b, CD29, CD31, CD45 y CD90 y se analizó su expresión por citometría de flujo. Solo los cultivos que cumplían los criterios establecidos (una expresión de los marcadores CD29 y CD90 $\leq 95\%$ y una expresión de los marcadores CD11b, CD31 y CD45 $\leq 5\%$) se usaron para trasplante. Este es un ejemplo representativo del análisis del fenotipo de las CMM previo a su uso en tratamiento.

La supervivencia tras la lesión cerebral fue del 83% (17% de mortalidad). Para poder llegar al número establecido de ratas por cada grupo experimental de $n=10$ se usaron un total de 24 animales, ya que cuatro murieron tras realizar el trauma.

Los cultivos de CMM derivados del tejido de médula ósea de los machos Wistar donantes se mantuvieron una media de cinco semanas hasta la obtención de las células necesarias para el trasplante. Una vez los cultivos alcanzaron aproximadamente un 90% de confluencia, las CMM se levantaron y caracterizaron fenotípicamente por citometría de flujo (Figura 1). Aquellas CMM que cumplían los criterios establecidos se prepararon para la realización del trasplante subaracnoideo. La supervivencia postrasplante fue del 100% tanto en el grupo A (con 2×10^6 CMM) como en el grupo B (con suero fisiológico).

Todos los animales del estudio ($N=20$) se valoraron funcionalmente antes de la realización de la lesión cerebral con el fin de poder establecer los valores basales de los mismos. Tras el establecimiento de la lesión cerebral, estos se evaluaron semanalmente para analizar los valores funcionales una vez alcanzado el estado crónico de la lesión cerebral.

Los datos obtenidos con el Tiempo de permanencia en la zona interior y en la Escala de valoración sensitivo-motora antes de realizar la lesión cerebral (basal) y en la fase crónica de la lesión cerebral (pre-tratamiento) se analizaron estadísticamente, observándose diferencias significativas ($*p \leq 0.05$), lo cual confirmó la existencia de una lesión cerebral cuantificable. Una vez alcanzada la fase crónica, los animales se separaron de forma aleatoria en los dos grupos experimentales establecidos ($n=10$ en cada grupo) y se volvieron a evaluar desde un punto de vista funcional. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los datos recogidos entre los dos grupos experimentales, indicando una homogeneidad en las lesiones cerebrales de los animales (Figura 2). Una vez realizados los

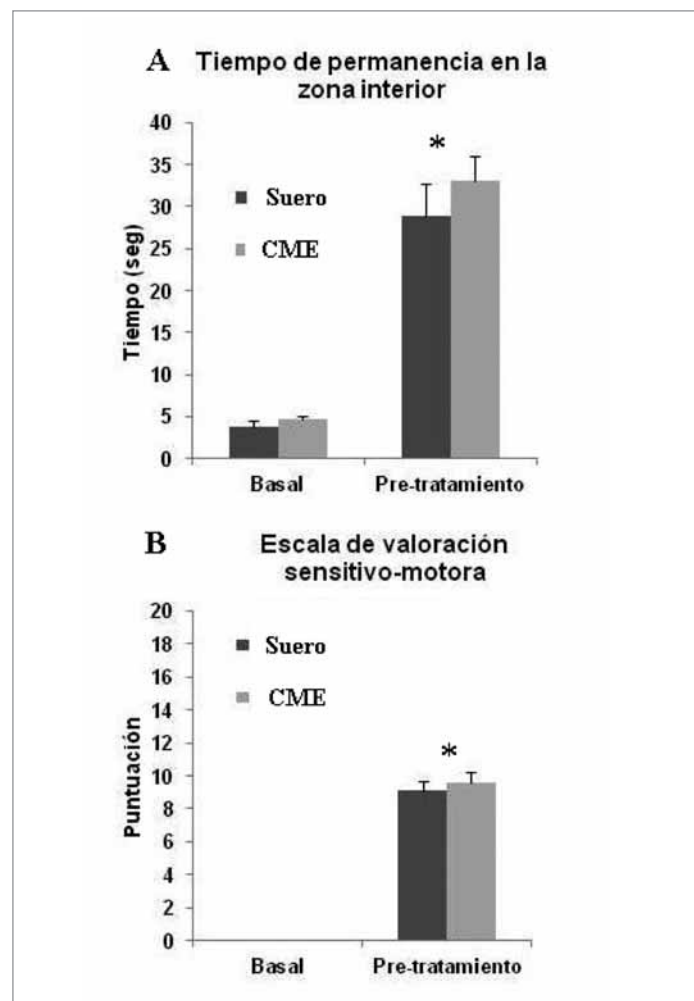


Fig. 2. Valores antes de realizar la lesión cerebral (basal) y antes de realizar los tratamientos (pre-tratamiento) obtenidos en el Tiempo de permanencia en la zona interior (A) y con la Escala de valoración sensitivo-motora (B). En ambos casos se obtienen diferencias significativas ($*p < 0.05$) entre los valores basales de los animales y los valores pre-tratamiento, lo cual indica la existencia de una lesión cerebral, mientras que no existen diferencias estadísticamente significativas al comparar los datos de los dos grupos experimentales incluidos en el estudio.

tratamientos, todos los animales se siguieron valorando funcionalmente cada semana hasta completar las ocho semanas de seguimiento del estudio.

El análisis de los resultados obtenidos con el Tiempo de permanencia de los animales en la zona interior del cubículo mostró que la evolución de los animales tratados con CMM fue muy similar a la evolución de los animales controles, no encontrándose diferencias significativas entre los animales de ambos grupos durante todos los puntos del estudio (Figura 3).

Los resultados obtenidos de la Escala de valoración sensitivo-motora tampoco mostraron diferencias significativas entre los animales tratados con CMM o con suero salino, observándose en ambos grupos una evolución similar en la recuperación de la lesión durante todo el tiempo del estudio (Figura 3).

Una vez finalizado el tiempo del tratamiento, se obtuvieron los cerebros de los animales lesionados para analizarlos macroscópicamente con el fin de poder detectar posibles diferencias en el tamaño de la lesión. Este análisis mostró diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de lesión entre los animales tratados con CMM y los animales tratados con suero ($p < 0.05$) (Figura 4).

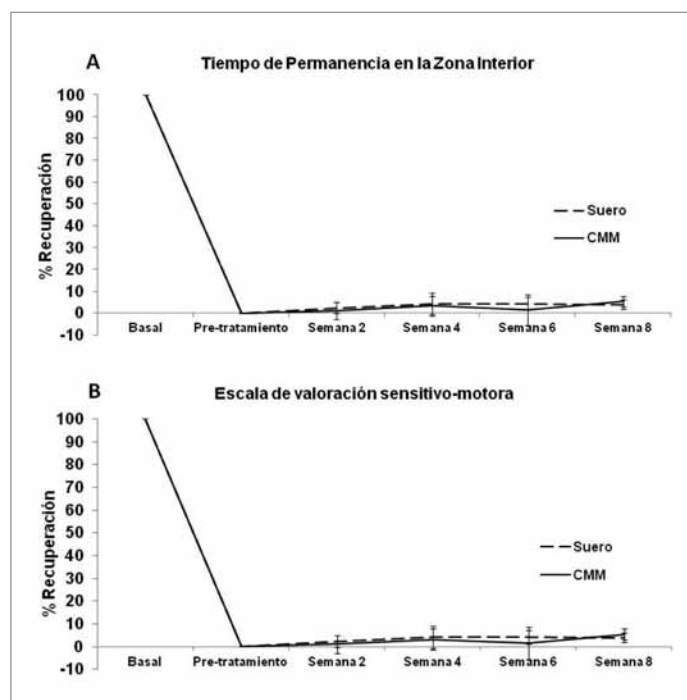


Fig. 3. Valoración funcional de los animales donde se muestra: A: perfil temporal del tiempo que los animales permanecen en la zona interior del cubículo obtenido a través del *Smart* del grupo tratado (CM) respecto del grupo control (suero); y B: perfil temporal de la evolución funcional a través de la escala sensitivo-motora del grupo tratado (CMM) respecto del grupo control (suero).

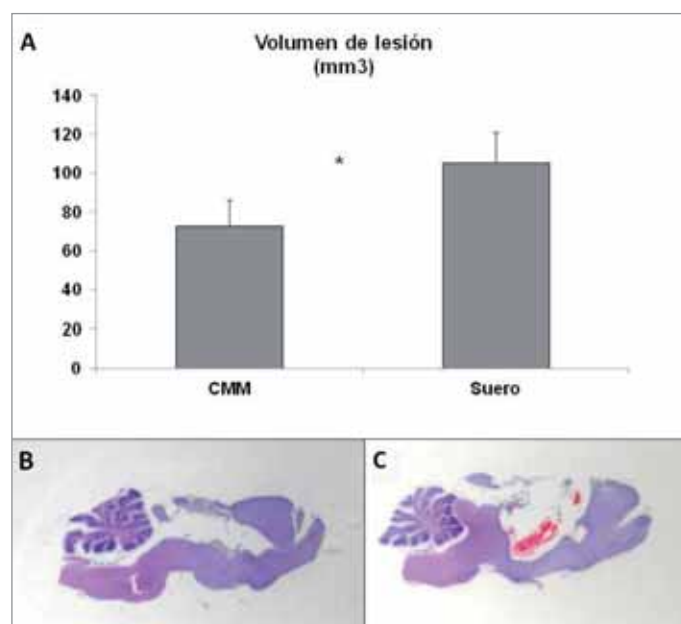


Fig. 4. A. Gráfica de barras donde se muestra el volumen de lesión de los animales tratados con CMM y suero salino. Se observó un volumen de lesión significativamente menor en animales tratados con CMM ($*p < 0.05$). Debajo, ejemplos de muestras de tejido donde se observa la cavidad postraumática en un animal tratado con CMM (B) y en un animal tratado con suero fisiológico (C).

El estudio de la expresión de los marcadores neuronales, gliales y de progenitores neurales (MAP-2, PGFA y nestina, respectivamente) no mostró diferencias evidentes en la expresión de estos marcadores entre aquellos animales que recibieron la terapia celular con CMM y los animales que recibieron el tratamiento control con suero fisiológico (datos no mostrados).

Por otro lado, se usó el marcador Ki-67 para intentar cuantificar las células en proliferación en el sitio de la lesión. Este recuento de aquellas células que se encuentran en proliferación no mostró diferencias significativas entre ambos grupos ($193,1 \pm 13,2$ en animales tratados con CMM frente a $207,5 \pm 16,7$ en animales control, respectivamente) (Figura 5).

Los estudios de hibridación *in situ* para la detección del gen Sry de las CMM trasplantadas mostraron un número pequeño de estas células distribuidas por los bordes de la cavidad post-traumática, indicando que al menos una parte de las células trasplantadas son capaces de llegar hasta el sitio de la lesión. No se detectaron células positivas al gen Sry en los animales del grupo control (Figura 6).

I Discusión

En el presente estudio se analiza la eficacia del trasplante subaracnoideo de CMM realizada dos meses después de

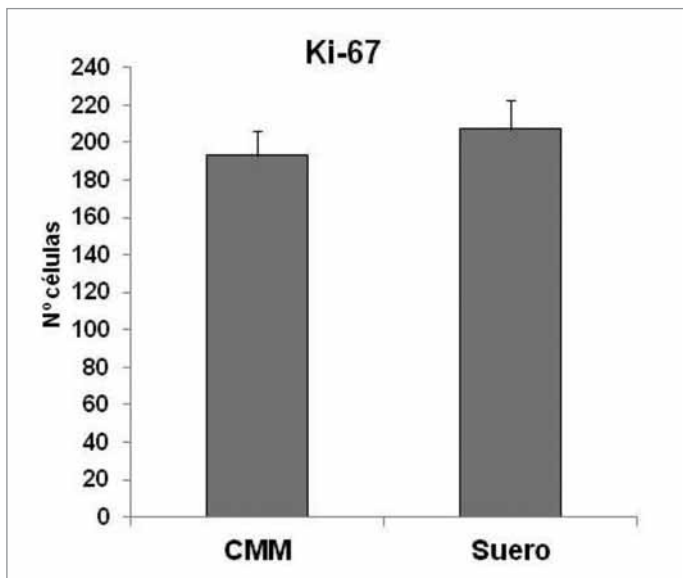


Fig. 5. Gráfica de barras donde se muestra el número total de células positivas a la proteína Ki-67 y que son aquellas que se encuentran en proliferación dentro del tejido cerebral. No se observaron diferencias significativas una vez realizados los tratamientos entre el grupo CMM y el grupo control.

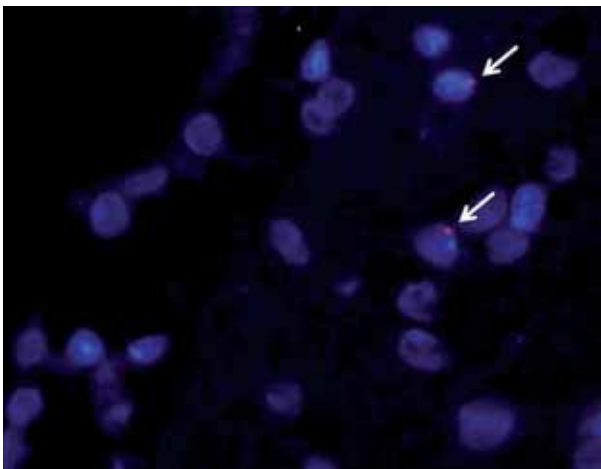


Fig. 6. Fotografía de la hibridación *in situ* fluorescente realizada sobre cortes de tejido de los cerebros donde se muestra el marcado Sry Y (rojo) de las células donantes utilizadas en los trasplantes (magnificación: 400x).

una lesión cerebral crónica y si este tratamiento puede tener efectos beneficiosos en los déficits neurológicos permanentes, a través de una terapia poco invasiva y que conlleva un mínimo riesgo en su administración.

Las estrategias basadas en terapias celulares pueden resultar muy interesantes para tratar las secuelas permanentes producidas en el tejido cerebral adulto, ya que el sistema nervioso tiene una capacidad limitada de reparación y regeneración. Las CMM parecen tener las características nece-

sarias para ser utilizadas como un tratamiento efectivo para abordar las enfermedades del SNC, entre ellas las enfermedades de origen traumático. Debido a que estas terapias presentan el potencial para ser llevadas a la clínica humana, es muy importante tener en cuenta aspectos como el momento de administración, la localización y el método de administración, así como los riesgos asociados al procedimiento y los costes del mismo.

Las terapias desarrolladas a través de vías intratecales o subaracnoideas son técnicas poco invasivas, seguras, relativamente simples de realizar y que conllevan un bajo coste económico añadido [21][22][24][25]. En estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio ya se ha demostrado la efectividad de la terapia intracerebral con CMM en modelos de lesión cerebral crónica [26], así como que dichas terapias fracasan cuando las células se administran vía intravenosa en animales con lesiones cerebrales permanentes [27]. Un problema que plantea la administración intralésional es la necesidad de realizar una cirugía invasiva para la administración de las células, con el consiguiente riesgo para el paciente. Sería interesante, por tanto, encontrar una vía de administración donde se potencie al máximo la efectividad de la terapia celular, que además sea poco agresiva para los pacientes, conlleve un bajo coste económico y que sea relativamente fácil de desarrollar en clínica. Por este motivo, en el presente trabajo se analizó el potencial terapéutico de la administración subaracnoidea de CMM en un modelo de lesión cerebral crónica realizado en roedores, como posible alternativa a la administración intralésional. Para ello, y una vez realizados los tratamientos, se llevaron a cabo tanto estudios de la evolución de la función neurológica como la localización de las células administradas dentro del tejido cerebral y su posible efecto sobre el mismo.

El modelo de TCE desarrollado en el presente trabajo causó pérdida de tejido cerebral y deficiencias motoras graves que fueron evidentes en todos los animales inmediatamente después de sufrir el trauma. A través de dos tests de valoración de la función neurológica (Tiempo de permanencia en la zona interior y Escala de valoración sensitivo-motora), se pudieron evaluar los posibles cambios neurológicos asociados al tratamiento subaracnoideo con CMM del daño cerebral. Con dichos tests se pudo comprobar que la terapia subaracnoidea con CMM dos meses después de la lesión cerebral grave no tiene ningún tipo de efecto positivo sobre la respuesta motora y sensorial de los animales tratados, siendo la evolución de estos animales similar a la de los animales a los que solo se les administró suero fisiológico y que se dejaron evolucionar el mismo periodo de tiempo.

A diferencia de los resultados encontrados en este estudio, hay trabajos publicados en la literatura en los que la terapia con CMM vía administración intratecal tiene efectos significativos sobre la recuperación motora y sensorial en animales con lesiones cerebrales [23, 28]. Posiblemente esto se deba a que en estos estudios las terapias se realizaron en fase aguda, donde las lesiones neurológicas no se han establecido y donde la actuación de las células sobre el tejido nervioso puede deberse más a un efecto neuroprotector que a un efecto reparador del tejido ya dañado. Por otro lado, sí que se obtienen diferencias significativas en el tamaño de lesión, algo similar a lo que se obtiene con el tratamiento en fase aguda, lo cual da idea de que aunque la terapia es insuficiente para producir mejoras funcionales significativas sí que tiene un efecto sobre la reestructuración del tejido cerebral. El hecho de no encontrar mejoras funcionales en los animales tratados quizás pueda deberse a que en el estudio histológico realizado no se encontró ninguna diferencia a nivel de expresión de marcadores neuronales, gliales y neurogénicos (MAP-2, PGFA y nestina, respectivamente). Tampoco se encontraron diferencias en el número de células proliferantes (células positivas a Ki-67) a nivel de la lesión entre el grupo de animales tratados con CMM y el grupo control, indicando que estas células formadas *de novo* se deben al curso natural que sigue este tipo de lesiones y no al tratamiento con CMM.

Muchos trabajos han demostrado la capacidad de las CMM de migrar al lugar de la lesión y de diferenciarse tras su administración subaracnoidea o intratecal, tanto en modelos de lesión medular [21][25] como en modelos de lesión cerebral, ya sea traumática [23] o en lesiones cerebrales isquémicas [28]. En el presente trabajo también se han localizado las células trasplantadas (células cromosoma Y positivas) dentro del tejido cerebral, sugiriendo que son capaces de alcanzar el tejido dañado e integrarse en el mismo, sobreviviendo al menos hasta dos meses después de su administración subaracnoidea. Este hecho podría explicar la mejora encontrada en el volumen de lesión. Posiblemente el bajo número de células detectadas dentro del cerebro, así como que el trasplante se realiza desde un punto muy alejado del foco de lesión (a nivel de las vértebras T6-T8) podrían ser motivos del poco efecto que tienen sobre la mejora de las secuelas de la lesión. Sería interesante conocer si estas CMM integradas además son capaces de diferenciarse hacia alguna de las células de tipo nervioso que forman parte del tejido cerebral.

Con todo ello parece que las CMM, cuando se administran vía subaracnoidea dos meses después de una lesión cerebral traumática grave donde las secuelas neurológicas es-

tán crónicamente establecidas, no demuestran tener ningún tipo de efecto en la mejora de las funciones neurológicas deterioradas, aunque sí se detectan diferencias histológicas en la regeneración del tejido cerebral dañado. Por tanto, quedan muchas cuestiones abiertas relacionadas con este tipo de terapias, como pueden ser el momento óptimo para realizar los trasplantes, la necesidad de realizar administraciones repetidas de la terapia celular bien cuando la vía elegida es intratecal o subaracnoidea o cuando se realice a través de otras vías, sobre la cantidad de células madre que hay que trasplantar para potenciar sus cualidades al máximo, o la necesidad de dejar evolucionar un mayor tiempo a los animales tratados, lo cual podría traducirse en mejoras neurológicas significativas a largo plazo. ■

Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE.

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 *et al.* 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. *Experimental Hematology* 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: Preparation 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 Transplant* 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; 61:264-370.
 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. Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol* 2002; 1:92-100.
 15. Hofstetter CP, Schwartz EJ, Hess D, Widnfalk J, El Manira A, Prockop DJ, *et al.* Marrow stromal cells from guiding strans in the injured spinal cord and promote recovery. *PNAS USA* 2002; 99:2199-204.
 16. 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.
 17. Zurita M, Vaquero J, Bonilla C, Santos M, De Haro J, Oya S, *et al.* Functional recovery of chronic paraplegic pigs after autologous transplantation of bone marrow stromal cells. *Transplantation* 2008; 86:845-53.
 18. Li Y, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 2009; 456:120-3.
 19. 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.
 20. 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.
 21. Bakshi A, Barshinger AL, Swanger SA, Madhavani V, Shumsky JS, Neuhuber B, *et al.* Lumbar puncture delivery of bone marrow stromal cells in spinal cord contusion: A novel method for minimally invasive cell transplantation. *J Neurotrauma* 2006; 23:55-65.
 22. Lepore AC, Bakshi A, Swanger SA, Rao MS, Fischer I. Neural precursor cells can be delivered into the injured cervical spinal cord by intrathecal injection at the lumbar cord. *Brain Res* 2005; 1045:206-16.
 23. Liu W, Jiang X, Fu X, Cui S, Du M, Cai Y, Xu R. Bone marrow stromal cells can be delivered to the site of traumatic brain injury via intrathecal transplantation in rabbits. *Neurosci Lett* 2008; 434:160-4.
 24. Seledtsov VI, Rabinovich SS, Parlyuk OV, Kafanova MY, Astrakov SV, Seledtsova GV, *et al.* Cell transplantation therapy in reanimating severely head-injured patients. *Biomed Pharmacother* 2005; 59:415-20.
 25. Swanger SA, Neuhuber B, Himes BT, Bakshi A, Fischer I. Analysis of allogeneic and syngeneic bone marrow stromal cell graft survival in the spinal cord. *Cell Transplant* 2005; 14:775-86.
 26. 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.
 27. Bonilla C, Zurita M, Otero L, Aguayo C, Rico MA, Rodríguez A, Vaquero J. Failure of delayed intravenous administration of bone marrow stromal cells after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2012; 29:394-400.
 28. Lim JY, Chang Jeong CH, Jun JA, Kim SM, Ryu CH, Yun Hou Y, *et al.* Therapeutic effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells after intrathecal administration by lumbar puncture in a rat model of cerebral ischemia. *Stem Cell Res Ther* 2011; 2:38.

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.