

Neurogénesis endógena tras el daño cerebral traumático y su modulación mediante terapia celular

Endogenous neurogenesis after traumatic brain injury and its modulation by cell therapy

Bonilla C¹, Zurita M¹, Otero L¹, Aguayo C¹, Rico MA¹, Vaquero J^{1,2}

¹ Unidad de Investigación Neurociencias. ² Servicio de Neurocirugía, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Estudiar la neurogénesis inducida por una lesión traumática cerebral y su modulación mediante terapia celular.

Material y métodos: Se realizó un modelo de lesión cerebral traumática en ratas Wistar adultas causando un daño cerebral grave. Transcurridos dos meses de la lesión, se administraron intralesionalmente células madre estromales (CME) alogénicas obtenidas de médula ósea, o suero fisiológico. Se estudió histológicamente la zona subventricular (ZSV) de cada animal al objeto de valorar la neurogénesis endógena espontánea tras la lesión y su posible modificación por la administración intracerebral de CME. Igualmente, se valoró la modificación de los déficit funcionales tras el tratamiento.

Resultados: Se detectó un aumento en la neurogénesis endógena en el grupo tratado con CME respecto del control. Este hallazgo estuvo asociado a una progresiva mejoría en la respuesta motora y sensorial en el grupo de animales que recibieron CME comparado con el grupo de animales control.

Conclusiones: La eficacia de la terapia celular para revertir los déficit funcionales secundarios a una lesión traumática cerebral parece correlacionarse con un incremento de la neurogénesis endógena a nivel de la SVZ.

Palabras clave:

Lesión traumática cerebral, terapia celular, células madre estromales, neurogénesis.

Abstract

Objective: To study the neurogenesis induced by traumatic brain injury and its modulation by cell therapy.

Material and methods: We performed a model of traumatic brain injury in adult Wistar rats, causing severe brain damage. After 2 months of injury, allogeneic bone marrow stromal cells (BMSC) or saline were administered intralesionally. We studied histologically the subventricular zone (SVZ) of each animal, in order to assess endogenous neurogenesis after traumatic brain injury and its possible modulation by intracerebral administration of BMSC. Furthermore, we studied the modification of neurological deficits after BMSC administration.

Results: We detected a rise in endogenous neurogenesis in the group treated with BMSC with respect to the control. This finding was associated with a progressive improvement in motor and sensory response in the group of animals that received BMSC compared with control animals.

Conclusion: The efficacy of cell therapy using BMSC appears to correlate with an increase of endogenous neurogenesis at SVZ level.

Key words:

Traumatic brain injury, cell therapy, stromal stem cells, neurogenesis.

Correspondencia

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

I Introducción

En los últimos años han aumentado exponencialmente las investigaciones relacionadas con las células madre adultas, entre ellas las células madre estromales (CME), obtenidas de la médula ósea, y sobre sus posibles aplicaciones terapéuticas. Aún es necesario aumentar los conocimientos que nos permitan su aplicación como una forma de terapia efectiva para muchas enfermedades que hoy día se consideran incurables, entre ellas las enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC).

Se han iniciado diversos ensayos experimentales que tratan de estudiar el efecto terapéutico de las CME en las secuelas del traumatismo craneoencefálico (TCE), con el propósito de encontrar datos que permitan aplicar esta forma de terapia celular en ensayos clínicos con pacientes. Igualmente, se han realizado numerosos estudios para conocer cuál es el mejor momento y la mejor forma de administrar las CME tras producirse el trauma cerebral [1-5].

Estudios realizados recientemente demuestran que las CME, tras ser trasplantadas en el parénquima lesionado, se diferencian a neuronas, integrándose en el tejido formando parte de circuitos neuronales y obteniéndose signos de recuperación funcional [6-8]. La hipótesis que se maneja al respecto señala que la recuperación funcional obtenida tras esta forma de terapia celular puede deberse a una interacción entre las células trasplantadas y el tejido cerebral, lo cual se refleja en una producción de factores de crecimiento y citoquinas cuyo efecto pudiera ser un aumento de la neurogénesis endógena y de la proliferación celular después del trasplante celular [9]. Por otro lado, recientes observaciones realizadas en nuestro laboratorio acerca de la plasticidad de las CME nos llevan a pensar que, bajo determinados estímulos, las CME pueden transdiferenciarse a células nerviosas, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo cual les confiere un carácter pluripotencial [10-12].

En el presente estudio nos hemos planteado verificar si el patrón basal de neurogénesis que tiene lugar tras un trauma cerebral experimental a nivel de la zona subventricular (ZSV) del cerebro se modifica por el trasplante intracerebral de CME alogénicas, y si este efecto se asocia a una mejoría de los animales, de acuerdo a tests de valoración funcional.

I Material y métodos

Utilizamos 20 ratas Wistar hembra, 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 objeto de expo-

ner 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

Se establecieron dos grupos experimentales (n =10 animales / grupo) a los dos meses de seguimiento tras la lesión traumática. Al grupo control se le administró suero fisiológico intracerebral en la zona de lesión, y al segundo grupo se le administró 3×10^6 CME intracerebralmente, suspendidas en suero fisiológico.

Obtención de CME de la médula ósea de ratas macho

Para la obtención de las CME donantes se utilizaron ratas Wistar macho adultas de 200-250 g de peso. La utilización de células donantes de macho obedece a la posibilidad de identificar en el tejido receptor la posible transdiferenciación neuronal de las CME trasplantadas, por medio del marcaje de un gen asociado al cromosoma Y, cuando el trasplante se realiza sobre animales receptores hembra que han sido sometidas a un TCE.

Tras sacrificar los animales donantes 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 las diáfisis con una jeringuilla y una aguja del n° 26, cargada con 2 cc de medio alfa-MEM completo, es decir, suplementado con 2mM de L-glutamina (Lonza), 100u/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 5 µg/ml de gentamicina (Lonza), sin deoxiribonucleótidos ni ribonucleótidos y con 20% FBS. Posteriormente, las células de la médula ósea se disgregaron mediante pipeteado y luego se filtraron a través

de una malla de nailon de 70µm. La suspensión celular resultante se sometió a recuento. Tras el mismo, las células fueron subcultivadas en frascos de 75 cm² en una concentración de 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, ya que las células madres mesenquimales son conocidas por su capacidad de crecer adheridas al plástico en contra de otros muchos tipos celulares. Cuando las células alcanzaron un desarrollo cercano a la confluencia, fueron levantadas del frasco y subcultivadas en frascos de 75 cm² en una concentración de 15.000 células/cm² en presencia de 12 cc de medio alfa-MEM completo/10% FBS.

Preparación de las CME para los trasplantes

Para obtener el material donante para el trasplante celular, células correspondientes a un primer pase (P1) fueron levantadas en condiciones estériles y bajo campana de flujo laminar. El botón celular obtenido se diluyó en suero fisiológico a la cantidad y volumen requerido para el trasplante (3x10⁶ CME y 30 µl de suero fisiológico) y cargado en una jeringuilla Hamilton de 50 µl, en condiciones estériles y bajo campana de flujo laminar.

Trasplante intralesional de CME

Trascurridos dos meses tras el TCE, todos los animales fueron nuevamente anestesiados como se explica más arriba. Se procedió a abrir una ventana sobre la misma zona donde dos meses antes se había realizado la craneotomía con el fin de exponer la cavidad post-traumática. Una vez realizada la abertura del campo quirúrgico, los trasplantes se desarrollaron con la técnica de nuestro laboratorio, previamente publicada [13] y según el grupo experimental correspondiente. Una vez cerrado el campo quirúrgico, las ratas se colocaron en una cámara con temperatura y humedad controladas y se realizaron cuidados postoperatorios acordes con su situación clínica, así como procedimientos diarios de vigilancia.

Estudios de eficacia terapéutica: valoración funcional

Se realizaron mediante la valoración de tests funcionales a los dos meses del trasplante, y por tanto, a los cuatro meses de la lesión traumática cerebral, independientemente del seguimiento de función neurológica semanal tras la lesión y a lo largo de todo el periodo de seguimiento evolutivo.

La Escala de valoración sensitivo-motora utilizada tiene una puntuación máxima de 19 puntos y es una escala modificada a partir del test del Neurological Severity Score

(NSS). Cuenta con una serie de valoraciones que abarcan la función motora, la sensorial, el test de equilibrio de la viga y la medida de ausencia de reflejos.

La coordinación y el equilibrio fue medida con el Rota-Rod, que representa un método clásico de medir el grado de lesión en animales de experimentación sometidos a TCE. Consta de un rodillo sobre el que se coloca el animal y que acelera progresivamente de 4 a 40 cm²/s durante un minuto. Los animales con lesiones cerebrales obtienen menos puntuación que los animales sanos, y la puntuación irá aumentando según sea más leve el grado de lesión.

Técnicas histológicas

A los dos meses de la realización de los tratamientos se sacrificó a los animales y se estudió histológicamente la ZSV de cada uno de ellos, al objeto de valorar la neurogénesis de dicha región mediante estudios con H.E. e inmunohistoquímicos, estudiando expresión de nestina (marcador de células madre neurales), doblecortina (Dcx, marcador de neuroblastos migrantes) y Ki-67 (marcador de proliferación celular). También se realizó el estudio de marcadores neuronales (MAP-2) y gliales (PGFA) como análisis general del tejido.

Una vez obtenidos los cerebros, se fijaron con 4% de paraformaldehído, incubándose uno o dos días a temperatura ambiente. Se realizó un bloque de parafina con cada hemisferio cerebral y se efectuaron cortes transversales de 5 µm de grosor en la totalidad de la muestra.

Para llevar a cabo los estudios inmunohistoquímicos se utilizaron cortes de las regiones adyacentes a la zona de lesión y de la ZSV. Las muestras se incubaron con buffer citrato (PH=6,0) en microondas durante 10 minutos entre 650-720 w. Después de lavar sucesivas veces los cortes con PBS, se expusieron en 3% H₂O₂ durante 30 minutos para bloquear la actividad de la peroxidada endógena. Antes de la incubación con el anticuerpo primario, las uniones inespecíficas se bloquearon con 3% de suero de cabra o de caballo. Tras incubar las muestras con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C, se procedió a incubar los cortes con un anticuerpo secundario conjugado con biotina 1:200 (Vector Inc, CA, USA). Posteriormente, los cortes se lavaron con PBS y se expusieron a un complejo avidina-biotina unido a peroxidasa (Vector Inc, CA, USA). El sustrato que se utilizó como cromógeno es 3',3'-diaminobenzidina (DAB). Las secciones se estudiaron bajo microscopio óptico. Para las muestras de fluorescencia, los anticuerpos secundarios utilizados fueron «Anti-mouse IgG» conjugado con cyanina 1:200 (Jackson ImmunoResearch) y «Anti-Rabbit IgG» conjugado con rodamina 1:200 (Jackson Im-

nunoResearch) durante una hora de incubación. Tras lavar los anticuerpos secundarios con PBS, los cortes se incubaron con DAPI y se montaron en glicerol. Los resultados se observaron bajo el microscopio de fluorescencia.

Identificación de las CME trasplantadas

Con el objetivo de localizar las CME inyectadas en el parénquima cerebral, se utilizaron, como se describió anteriormente, células procedentes de donantes macho y se trasplantaron en ratas receptoras hembra. Posteriormente se realizó la técnica de la hibridación *in situ* del gen SRY del cromosoma Y, identificando así las CME trasplantadas. Con ese objetivo, secciones procedentes del área de trasplante fueron desparafinadas y deshidratadas con xilol y una serie gradual de alcoholes. A continuación, 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 contiene los siguientes componentes: 2% DNA de Salmon Test, 10% de dextransulfato, 10% de 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 fue visualizada a través de una inmunofluorescencia, usando un anticuerpo primario anti-biotina mouse IgG (1:100, Jackson) y un anticuerpo secundario conjugado con rodamina (TRICT anti-mouse IgG (1:200, Jackson). Los cortes fueron incubados con 4' 6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI)(Merck) y montados con glicerol. Se realizaron controles negativos, sin añadir la sonda al *mix* de hibridación, así como controles positivos, realizándose la hibridación 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 los datos que presentaron una $p < 0.05$. El programa de análisis estadístico SPSS fue usado como método de ayuda.

Resultados

Evolución de la función neurológica

Tras la administración de los tratamientos se observó una mejora significativa en los animales trasplantados con CME respecto de los animales controles.

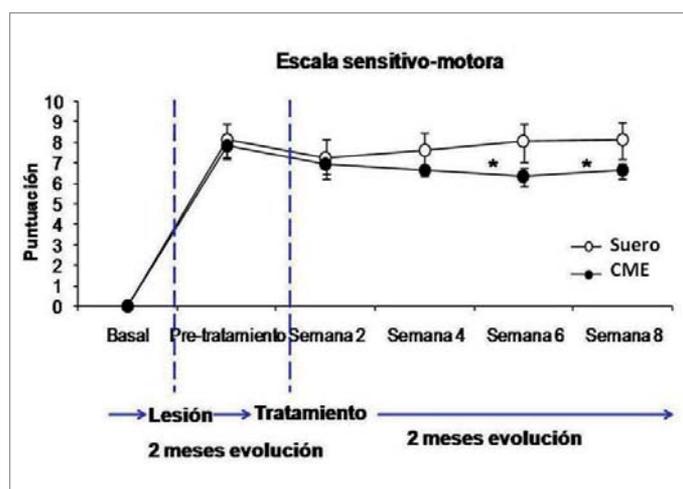


Fig. 1. Gráfica que muestra el perfil temporal de la recuperación funcional a través de la Escala sensitivo-motora del grupo tratado (CME) respecto del grupo control (suero).

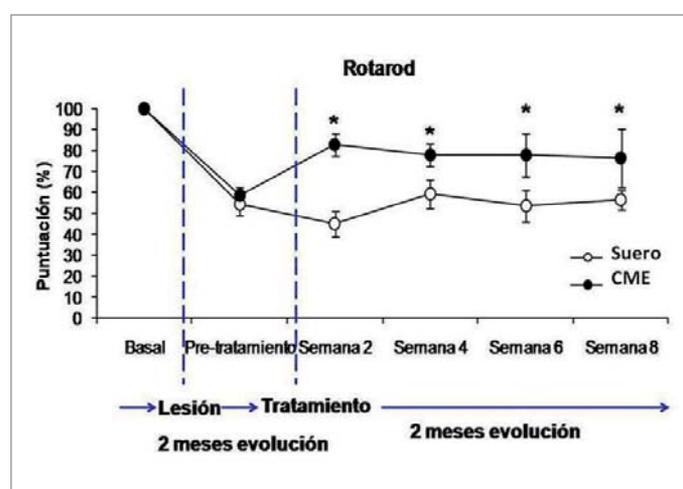


Fig. 2. Gráfica que muestra el perfil temporal de la recuperación funcional a través de las medidas tomadas con el Rotarod del grupo tratado (CME) respecto del grupo control (suero).

En la Escala de valoración sensitivo-motora (Figura 1) se observó una mejora continua y progresiva de los animales trasplantados con CME respecto de los controles. Dicha recuperación comenzó a partir de la semana 6, manteniéndose en la semana 8 tras el trasplante ($p < 0.05$).

El Rotarod mide la coordinación y el equilibrio de los animales, los cuales se ven muy disminuidos tras el daño cerebral. Al realizar el trasplante de CME, se detectó una mejora progresiva en la función motora respecto del grupo control, como se muestra en la Figura 2, la cual fue significativa en todos los puntos del modelo, comenzando en la semana 2 tras el tratamiento ($p < 0.05$).

Hallazgos histológicos

Al finalizar el estudio se realizaron estudios morfológicos utilizando los cortes teñidos con H-E, sin detectarse cambios evidentes en el volumen de la zona de lesión traumática cuando se comparó el grupo trasplantado con CME y el grupo de animales que recibieron únicamente suero fisiológico. Dentro de la ZSV se constató un aumento en la celularidad en los animales trasplantados con CME respecto de los controles, observándose aglomerados celulares en dicha ZSV que parecen formar vías a través del parénquima cerebral que invaden la zona de lesión (Figura 3). Tanto en la ZSV como en el área de la lesión se observó un número variable de células positivas a MAP-2 y PGFA.

Neurogénesis y proliferación

El estudio de la expresión de nestina y Dcx mostró que aquellos animales que recibieron la terapia celular con CME tenían una mayor expresión a ambos marcadores respecto de los animales que recibieron el tratamiento control con suero fisiológico (Figura 4).

En cuanto al recuento de aquellas células que se encuentran en proliferación (Figura 5), se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en la ZSV ($31,1 \pm 6,5$ y $22,5 \pm 4,6$ células totales del grupo CME y control, respectivamente). En la zona de lesión, el número de células positivas a Ki-67 fue mayor que en los controles, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($18,9 \pm 5,4$

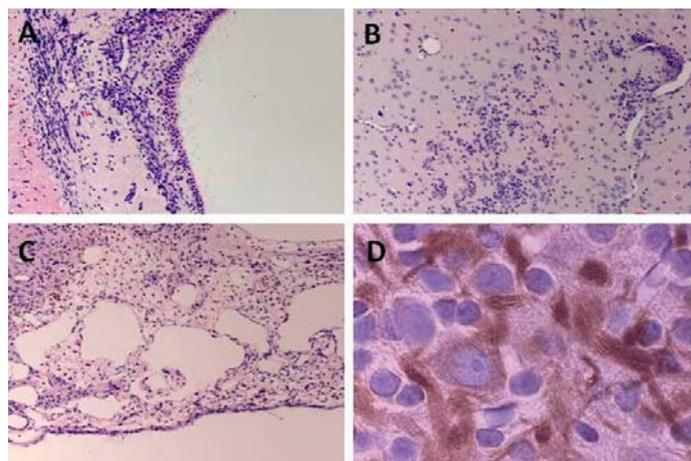


Fig. 3. Cortes histológicos de ratas que recibieron CME. A: Penetración en el parénquima, cerca de la lesión, de células desde la ZSV (H.E., aumento 200x). B: Aglomerados celulares intraparenquimatosos cercanos a la zona de lesión (H.E., aumento de 200x). C: Puentes tisulares en el borde de la lesión cerebral (H.E, aumento de 200x). D: Zona donde se muestran células positivas a MAP-2 y células con aspecto de neuroblastos (aumento 400x).

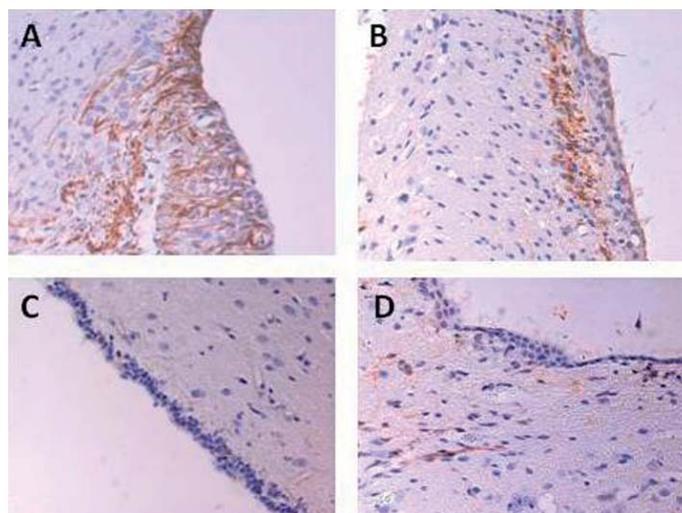


Fig. 4. Estudios inmunohistoquímicos de Nestina (A, C) y Dcx (B, D), donde se observa una mayor expresión de Nestina y Dcx en los animales que recibieron CME (A,B) respecto de los que recibieron el tratamiento control con suero (C,D).

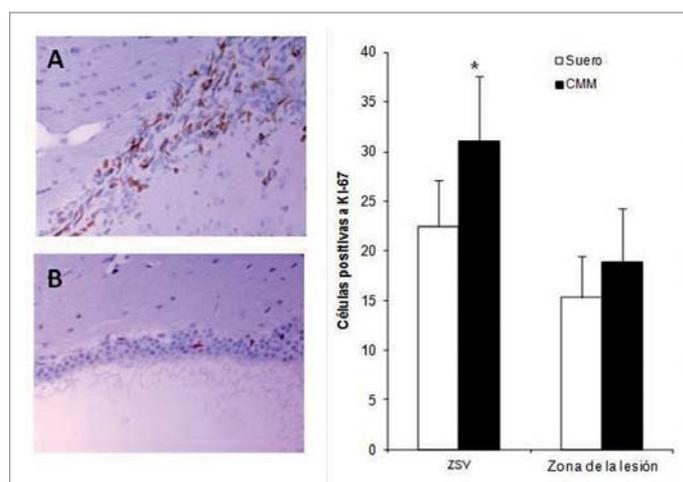


Fig. 5. Gráfica de barras y estudios inmunohistoquímicos, donde se observa la diferencia en el número de células positivas a Ki-67 en la ZSV y en la zona de lesión entre ratas del grupo control (suero) y ratas trasplantadas con CME. El grupo con CME presenta más cantidad de células positivas que el grupo control, mostrando diferencias significativas a nivel de la ZSV ($p < 0.05$), pero no en la zona de lesión A: Expresión de Ki-67 en la ZSV de ratas del grupo tratado con CME (aumento 200x). B: Célula aislada presentando positividad a Ki-67, corte histológico de una rata del grupo control (aumento 400x).

células en el grupo trasplantado con CME en comparación con $15,3 \pm 4,2$ del grupo control, $p > 0.05$).

Dentro de la zona de lesión, en los animales del grupo tratado con CME se localizaron, a través de la microscopía de fluorescencia, células con un fuerte marcaje a nestina, siendo algunas de ellas también positivas para Ki-67.

Detección de las CME trasplantadas

Los estudios de hibridación *in situ* para la detección del gen Sry de las CME trasplantadas mostraron un número variable de dichas células distribuidas por todos los bordes de la cavidad post-traumática, localizándose principalmente en la zona de la lesión. No se detectaron células positivas al gen Sry en los animales del grupo control. Los estudios de hibridación *in situ*, junto con la expresión de marcadores neuronales y gliales, mostraron la existencia de CMW positivas para Neu-N o PGFA dentro de la zona de lesión (Figura 6).

Discusión

Debido a la limitada capacidad de reparación del SNC tras sufrir un daño cerebral traumático, se han desarrollado diferentes terapias celulares con el objetivo de aumentar dicha capacidad regenerativa. Las CME son relativamente fáciles de aislar y pueden ser expandidas en cultivo para realizar trasplantes autólogos en pacientes. Dichas células han sido utilizadas en diferentes trabajos experimentales para tratar enfermedades y lesiones sobre el SNC [8][14-17] y son consideradas actualmente como buenos candidatos en el desarrollo de protocolos de actuación para tratar las secuelas producidas como consecuencia de un TCE. Se sabe que la administración intravenosa e intralesional de CME tiene efectos beneficiosos sobre la recuperación funcional en ratas que previamente habían sufrido un daño cerebral traumático cuando la terapia se realiza durante la primera semana tras el trauma [2][3][18]. Los resultados obtenidos en el presente estudio han demostrado que dicha terapia es igualmente beneficiosa cuando la administración se realiza intralesionalmente en ratas con dos meses de evolución tras

un TCE. El grupo experimental al que se le administró intralesionalmente suero no presentó mejoras motoras, mientras que los animales a los que se les trasplantó intralesionalmente CME de la médula ósea mostraron una evidente y progresiva recuperación en la función neurológica, comenzando a las pocas semanas después del tratamiento. Estas observaciones apoyan los resultados descritos previamente por otros grupos de investigación, que señalan que la administración de CME, en fases tempranas tras producirse un TCE, disminuye los déficit funcionales tras una lesión traumática cerebral [1][2][14][19-21].

El hecho de que se puedan transdiferenciar las CME del estroma de la médula ósea hacia un fenotipo neuronal abre numerosas posibilidades para el tratamiento de enfermedades y lesiones del SNC. En los últimos años se han multiplicado los estudios que demuestran cómo este proceso de transdiferenciación puede ser obtenido tanto en cultivo de tejidos como en el seno del tejido nervioso, cuando las CME adultas se implantan en zonas previamente lesionadas [22][23]. Como consecuencia de ello, cabe plantearse si a la hora de intentar una terapia celular para reparar lesiones neurológicas no es necesario recurrir a procedimientos de manipulación de las CME antes de su implante en el tejido nervioso, ya que el proceso de transdiferenciación neuronal que estas células experimentan debe estar relacionado con factores neurotróficos que influyen sobre su diferenciación, que están presentes en el propio tejido nervioso [10][11].

Los resultados obtenidos en el modelo de trasplante de CME para tratar las secuelas del TCE crónico desarrollado en este trabajo muestran que existen diferencias entre los animales controles y las ratas trasplantadas con CME a nivel de la zona de lesión. En aquellos animales que recibieron CME, la cavidad necrótica muestra algunos puentes tisulares en los cuales se localizaron células donantes positivas al gen Sry, y algunas de ellas coexpresando Neu-N o PGFA. Esto supone que las células trasplantadas no solo han sobrevivido dos meses desde su administración, sino que se han transdiferenciado después de ser trasplantadas dentro del cerebro. Se han descrito resultados similares tras realizarse un trasplante con CME en modelos de paraplejía experimental [24].

Las terapias con CME pueden tener asociadas numerosas ventajas, como son la activación de ciertos mecanismos en las células endógenas, aumentando su capacidad proliferativa y disminuyendo el espesor de la cicatriz glial a lo largo de la zona de lesión [25]. Cuando las CME son administradas en estados precoces después de un daño cerebral [1][2][4][21], o cuando son administradas localmente en

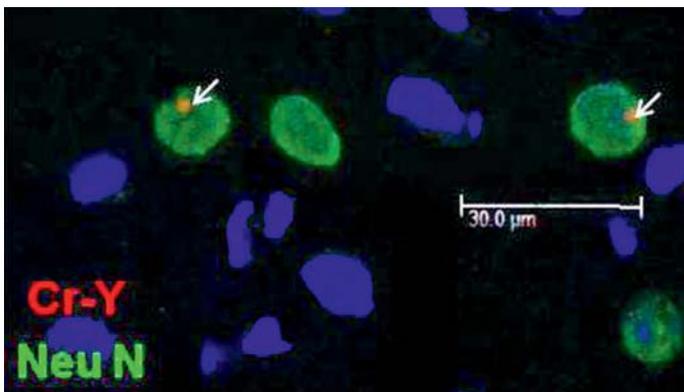


Fig. 6. Estudio de microscopía de fluorescencia en el cerebro de ratas hembra trasplantadas con CME donantes de ratas macho. Co-marcaje de los genes Sry (rojo) del cromosoma Y y Neu-N (verde) indicando que existe transdiferenciación hacia neuronas maduras de las CME trasplantadas (aumento 400x).

modelos de paraplejia crónica [17][24], se comienza a observar una continua recuperación funcional desde momentos muy tempranos tras la realización de los tratamientos, algo similar a lo que se ha observado en el presente trabajo.

Posiblemente la migración de las células hacia la lesión, su integración y diferenciación hacia elementos neurales, así como el establecimiento de conexiones funcionales con las propias células del tejido, no se puede producir dentro de cortos periodos de tiempo, siendo más probable que estos efectos tempranos sobre la recuperación funcional estén mediados por otros mecanismos diferentes a la interacción de las CME trasplantadas con el cerebro [26]. Parece que existen diversos mecanismos que actúan sobre la recuperación funcional que se produce al realizar los trasplantes, entre ellos la expresión de factores neurotróficos o la activación de mecanismos endógenos capaces de restaurar las funciones neurológicas [27].

Hoy en día se sabe que la neurogénesis endógena puede ocurrir a lo largo de toda la vida en el SNC debido a la existencia de células madre neurales (CMN), fundamentalmente a nivel de la ZSV [28]. Está ampliamente aceptado que las células progenitoras de la ZSV son capaces de responder a diferentes tipos de estímulos producidos como consecuencia de un trauma, aumentando su proliferación y migrando hacia las zonas dañadas [29][30]. Existen estudios que sugieren que la administración intracerebral de CME promueve la proliferación de las células madre neurales endógenas de la ZSV [31]. En el presente trabajo, este aumento local de la neurogénesis está asociado con la presencia de rutas de migración desde la ZSV hacia la zona de lesión, donde se localiza la co-expresión de nestina y Ki-67. Parece que dicho aumento de la neurogénesis endógena tras el trauma cerebral puede explicar la recuperación que sufren algunos pacientes durante las primeras semanas tras haber sufrido el trauma, lo cual podría potenciarse a través de las terapias celulares intentando restaurar el daño cerebral y ofreciendo una nueva vía de investigación con la que estimular el aumento de la propia neurogénesis del cerebro a partir de tratamientos con células madre.

Como consecuencia de nuestras presentes observaciones, parece que cuando las CME se administran intracerebralmente dos meses después de una lesión traumática cerebral grave, en un momento en que las secuelas neurológicas están ya crónicamente establecidas, se mejora significativamente el grado de lesión neurológica. Este efecto beneficioso de las CME puede estar relacionado con la supervivencia y diferenciación neural de las células trasplantadas dentro del tejido cerebral, así como con un claro incremento de la neurogénesis endógena, la cual se mantiene en el tiempo. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lu D, Li Y, Wang L, Chen J, Mahmood A, Chopp M. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2001; 18:813-9.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Harting MT, Jiménez F, Xue H, Fischer UM, Baumgartner J, Dash PK, Cox CS. Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2009; 110:1189-97.
8. Li Y, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury. *Neurosci Lett.* 2009; 456:120-3.
9. Mahmood A, Lu D, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain. *Neurosurgery* 2004; 55:1185-93.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

13. 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.
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, Olson L. Marrow stromal cells from guiding strans in the injured spinal cord and promote recovery. *PNAS USA* 2002; 99:2199-204.
16. Ankeny DP, McTigue 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, Aguayo C. Functional recovery of chronic paraplegic pigs after autologous transplantation of bone marrow stromal cells. *Transplantation* 2008; 86:845-53.
18. 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.
19. Lu J, Moochala 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.
20. 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.
21. Mahmood A, Lu D, Qu C, Gousse A, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury with a combination therapy of marrow stromal cells and atorvastatin in rats. *Neurosurgery* 2007; 60:546-53.
22. Brazelton TR, Rossi Fabio MV, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000; 290:1775-9.
23. Mezey E, Chandross KJ. Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system. *Eur J Pharmacol* 2000; 405:297-302.
24. Zurita M, Vaquero J. Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: functional and morphological outcome one year after transplantation. *Neurosci Lett* 2006; 402:51-6.
25. 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.
26. Andrés RH, Guzmán R, Ducray AD, Mordasini P, Gera A, Barth A *et al*. Cell replacement therapy for intracerebral hemorrhage. *Neurosurgical Focus* 2008; 24:3-4.
27. Vaquero J, Zurita M. Bone marrow stromal cells for spinal cord repair: A challenge for contemporary neurobiology. *Histol Histopathol* 2009; 24:107-16.
28. Lois C, Álvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1993; 90:2074-7.
29. Romanko MJ, Rola R, Fike JR, Szele FG, Dizon ML, Felling RJ *et al*. Roles of the mammalian subventricular zone in cell replacement after brain injury. *Progr Neurobiol* 2004; 74:77-99.
30. Masuda T, Isobe Y, Aihara N, Furuyama F, Misumi S, Kim T *et al*. Increase in neurogenesis and neuroblast migration after a small intracerebral hemorrhage in rats. *Neurosci Lett* 2007; 425:114-9.
31. Yoo SW, Kim SS, Lee SY, Kim HS, Lee YD, Suh-Kim H. Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. *Exp Mol Med* 2008; 40:387-97.

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.