

ORIGINAL

Efecto neuroprotector de las células madre mesenquimales adultas en las fases iniciales de una lesión traumática de la médula espinal

Neuroprotector effect of adult mesenchymal stem cells in the early phases after spinal cord injury

Vaquero J, Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Oya S, Zurita M

Unidad de Investigación Neurociencias, Cátedra FUNDACIÓN MAPFRE-UAM para Investigación en Daño Cerebral, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivos: Estudiar el efecto de la administración precoz de células madre adultas mesenquimales sobre la apoptosis en las fases iniciales de un traumatismo medular experimental.

Material y métodos: se sometieron 20 ratas Wistar adultas a una lesión traumática estandarizada por contusión, a nivel dorsal medio. Dos horas tras la lesión, 10 animales recibieron una inyección intralesional de 10 μ l de suero fisiológico y otras 10 recibieron 10⁶ células madre mesenquimales adultas de médula ósea. Cinco animales de cada grupo se sacrificaron a las 8 horas y otros 5 animales a las 72 horas de la lesión. Se realizaron estudios histológicos e histomorfométricos con H&E y con marcador Mab F7-26 (apostain).

Resultados: En los animales control, el número medio de células nerviosas expresando apostain fue de 138 ± 16 , a las 8 horas de la lesión, y de 82 ± 13 , a las 72 horas mientras que en el grupo tratado el número de células nerviosas marcadas con apostain fue de 76 ± 11 , a las 8 horas, y de 57 ± 7 , a las 72 horas tras la lesión con diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p < 0,05$).

Conclusión: La administración intralesional de células madre mesenquimales adultas ejerce un efecto neuroprotector en las fases precoces de un traumatismo medular grave disminuyendo el número de células nerviosas apoptóticas.

Palabras clave:

Células madre adultas. Apoptosis. Apostain. Traumatismo medular.

Abstract

Aim: To study if the intralesional administration of adult mesenchymal stem cells modifies the number of apoptotic nervous cells in the early phases after severe spinal cord injury (SCI).

Material and methods: Twenty adult Wistar rats were subjected to SCI at dorsal level. Two hours after the lesion, in 10 animals a volume of 10 μ l of saline into the lesion were administered. Other 10 animals received 10⁶ bone marrow stromal cells obtained. Five animals of each group were sacrificed at the 8 hours after the lesion and the other 5 animals at the 72 hours. The spinal cord was processed in each animal for conventional histological studies and to identify cells in apoptosis using the marker Mab F7-26 (apostain). The number of cells in apoptosis with appearance of neurons or glial cells was quantified in each group, averaged and subjected to statistical comparisons.

Results: In the control group the number of nervous cells expressing apostain was 138 ± 16 , at the 8 hours and 82 ± 13 at the 72 hours after lesion. In the treated group the number of nervous cells expressing apostain was 76 ± 11 , at the 8 hours, and 57 ± 7 , at the 72 hours with statistically significant differences between the experimental groups.

Conclusions: The intralesional administration of mesenchymal stem cells exercises an antiapoptotic effect in the precocious phases after severe SCI.

Key words:

Adult stem cells. Apoptosis. Apostain. Spinal cord injury.

Correspondencia

J. Vaquero
Hospital Puerta de Hierro. Majadahonda, Madrid.
jvaquero@telefonica.net

I Introducción

Es conocido que tras una lesión traumática del sistema nervioso se produce, de forma precoz, una pérdida de neuronas y de células gliales. La lesión traumática origina, en primer lugar una necrosis celular que se traduce morfológicamente por una disrupción de la membrana celular que da lugar a alteraciones metabólicas irreversibles. Por otra parte, en las últimas décadas ha cobrado importancia el conocimiento de las llamadas lesiones secundarias, que se desarrollan en las horas o días que siguen al traumatismo y que aumentan el daño tisular producido de forma primaria por el impacto. Teóricamente, sobre estas lesiones secundarias podríamos actuar mediante el empleo de sustancias «neuroprotectoras», capaces de disminuir su intensidad, o bien su extensión, en el tejido nervioso adyacente a la zona del impacto. Entre estas lesiones secundarias que aumentan el daño inicial tendríamos los fenómenos de apoptosis.

La apoptosis es una forma de muerte celular, diferente a la necrosis, por la que cada organismo regula de forma natural el número de células que constituyen los diferentes tejidos. Representa un mecanismo biológico activo y programado, con participación de la propia célula en su inicio y progresión (muerte celular programada) que permite eliminar células individuales que no tienen ninguna función porque han sido generadas en exceso, se desarrollan incorrectamente o son perjudiciales para el propio individuo [1].

Aunque aún desconocemos muchos detalles del mecanismo por el cual se desencadena la apoptosis, parece ser que ésta puede ser inducida por numerosos factores exógenos, tales como el acúmulo de ácido glutámico, iones de calcio o radicales libres [2,3], por factores proteicos, tales como Fas ligando [4,5], o como consecuencia del acúmulo de sustancias excretadas por algunas células, como pueden ser ciertas citoquinas o el óxido nítrico [6-8].

En cualquier caso, el punto final de la apoptosis de las células nerviosas (neuronas y glía) tras el daño traumático es la fragmentación sistemática del ADN celular con el colapso de la estructura nuclear, seguido de la formación de cuerpos apoptóticos cubiertos por membrana, que son posteriormente fagocitados por macrófagos, atraídos a su vez por el depósito de fosfatidil-serina en la superficie de la membrana celular.

Por otra parte, se considera que existen al menos dos posibles vías en el desarrollo de los mecanismos de apoptosis. Una, que incluye la activación de una familia de proteasas, llamadas «caspasas» y otra, que incluye la liberación de factores apoptóticos desde la mitocondria, independiente de las caspasas.

Dado que la apoptosis contribuye de manera importante a la muerte celular en el llamado daño secundario tras un trauma-

matismo, la detención de este proceso podría minimizar la lesión y se han ensayado inhibidores de las caspasas o diversas moléculas que logran disminuir los fenómenos locales de apoptosis tras una lesión traumática. Entre los inhibidores de las caspasas se incluye un grupo de péptidos de pequeño tamaño, como el Ac-DMQD-CHO, un inhibidor selectivo de la caspasa-3 [9] y algunos fármacos más recientes, no peptídicos.

En el caso de la médula espinal, está demostrado, tanto en estudios experimentales como en humanos, que tras un traumatismo medular grave se produce una necrosis centromedular responsable de la pérdida de células, y que de forma secundaria, se desarrollan fenómenos de apoptosis que pueden contribuir a la gravedad e irreversibilidad del daño medular [10].

La implicación de la apoptosis en los traumatismos medulares fue demostrada por Crowe et al, [11] como causante, en parte, de la degeneración tisular en el sitio de lesión y de la producción de tractos de desmielinización crónica en zonas distantes de la lesión, provocando una desmielinización posttraumática. Existen numerosos estudios clínicos y experimentales que ponen de manifiesto la implicación de la apoptosis tras un traumatismo medular en la patogénesis de los daños secundarios post-traumáticos, planteando el desarrollo de terapias antiapoptóticas que disminuyan la magnitud de estos daños [10-16].

Los estudios experimentales utilizando técnicas de terapia celular con células madre adultas mesenquimales son un intento de tratar las secuelas del daño cerebral y medular, sin que se tengan muchos datos acerca de los mecanismos por los cuales estas técnicas logran recuperación funcional en una fase precoz, antes de que puedan inducir fenómenos de regeneración tisular. Se han señalado, como hipótesis, que las células madre mesenquimales pueden liberar factores neurotróficos, estimular mecanismos de reparación endógenos, por activación de células madre neurales y también que las células madre mesenquimales adultas pueden ejercer un mecanismo neuroprotector inhibiendo la apoptosis [17], sin que se conozca realmente la importancia de este mecanismo en el caso del trasplante de células madre adultas sobre lesiones cerebrales o medulares. El objetivo de este estudio es analizar el efecto antiapoptótico que puede lograr la presencia de células madre adultas mesenquimales en las fases precoces de un trauma medular.

I Material y métodos

Lesión traumática medular y grupos experimentales

Se utilizaron ratas Wistar (hembras adultas) con un peso entre 250 y 300g. Todos los animales fueron anestesiados mediante la administración intraperitoneal de una mezcla

de diazepam (0.5 mg/100 g de peso corporal) y ketamina (75 mg/kg de peso corporal).

Los animales fueron sometidos a una laminectomía T6-T8 para exponer la duramadre. La lesión fue causada mediante el impacto sobre la zona medular expuesta de una barra cilíndrica de acero con superficie de sección de 12 mm². El peso total de la barra era de 25 g y se dejó caer verticalmente sobre la superficie de la médula espinal desde una altura de 10 cm, para lo cual era guiada a través de un cilindro hueco adaptado al área de la laminectomía previa. A partir de este momento, las ratas fueron divididas al azar en 2 grupos experimentales, un grupo control (n: 10) que recibieron, en la zona de la lesión traumática, una inyección de 10 µl de suero fisiológico, 2 horas tras la lesión y otro grupo de animales tratados (n: 10) que recibieron intralesionalmente 10⁶ de células madre adultas mesenquimales, obtenidas de la médula ósea de ratas singénicas, previamente preparadas para el experimento.

Las células madre así obtenidas fueron inyectadas en la zona de lesión medular por medio de un microinyector (mod 310, Stoelting Co, Wood Dale, IL, EEUU) en un volumen total de 10 µl de suero fisiológico y a un ritmo de administración de 0,5 µl/min.

Los animales de cada uno de los dos grupos experimentales fueron sacrificados a las 8 horas (n:5) y a las 72 horas tras la lesión traumática medular. La zona de laminectomía fue extraída en bloque y fijada para procesamiento posterior, histológico e inmunohistoquímico. Todos los animales fueron manejados siguiendo la normativa legal española acerca de la utilización de animales de laboratorio y los principios para el cuidado y manejo de animales establecidos por la Sociedad Americana de Investigación Médica.

Obtención de las células madre mesenquimales adultas y caracterización fenotípica

Para la obtención de las células madre mesenquimales se utilizó un total de 10 ratas machos Wistar 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 a 4°C en medio alfa-MEM/10%FBS suplementado con antibiótico. Tras cortar las epífisis de los huesos en condiciones estériles se extrajo la médula ósea mediante lavado de los huesos con una jeringuilla de insulina y aguja del n° 26 cargada con 2 ml de medio alfa-MEM completo, suplementado con antibiótico, y 10% de suero fetal bovino. Posteriormente las células de la médula ósea fueron disgregadas mediante pipeteado y luego filtradas a través de una malla de nilón de 70 micras. La suspensión celular obtenida fue sometida a una centrifugación en gradientes de densidad (técnica de Ficoll-Hypaque) y cultivadas en frascos de 175 cm² e incubadas en una estufa a 37°C con un 5% de CO₂. A las 48 horas de incubación, el sobrenadante conteniendo restos celulares y células no adherentes fueron eliminados, recogiendo solamente las células adherentes. El cultivo se lavó con *buffer* fosfato salino (PBS), pH7,4, añadiendo 12 ml de medio alfa-MEM completo con 20% de FBS, que era reemplazado cada 2-3 días, durante 14 días. Cuando las células alcanzaron un desarrollo cercano a la confluencia, éstas fueron levantadas del frasco de cultivo mediante su incubación con 3 ml de tripsina 0.25%/1mM EDTA durante 4-5 minutos a 37°C. Tras este periodo de incubación, la tripsina fue inactivada con 6 ml de medio alfa-MEM completo. Las células obtenidas, tras ser centrifugadas a 1200 rpm durante 15 minutos, fueron lavadas al menos dos veces con medio alfa-MEM/10%FBS mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos cada lavado. Finalmente el *pellet* obtenido fue diluido en medio alfa-MEM/20%FBS y sometido a recuento mediante el test de viabilidad de azul tripán. Tras el recuento, las células madre fueron subcultivadas en frascos de 75 cm² en una concentración de 8x10³ células/cm² en presencia de 12cc de medio alfa-MEM/20%FBS con antibióticos y glutamina, a una concentración de 2mM.

Para caracterizar inmunohistoquímicamente las células madre obtenidas, fueron puestas en cultivo con medio alfa-MEM/20%FBS suplementado con antibióticos y glutamina, sobre portaobjetos estériles e incubadas a 37°C y con un 5% de CO₂. Al cabo de 48 horas de cultivo los portaobjetos fueron lavados con *buffer* PBS y fijadas con paraformaldehído tamponado al 4%. A continuación, tras llevar a cabo el desmascaramiento antigénico de las células con *buffer* citrato pH.6 durante 10 minutos en microondas, se procedió a inhibir la peroxidasa endógena mediante la incubación de las células con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 30 minutos. Tras lavar las células con PBS, se procedió al bloqueo de los sitios no específicos mediante la incubación de las células con suero no inmune de caballo al 8% durante 30 minutos. Sin lavar las muestras, se añadió el anticuerpo primario y se dejó incubar toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Tras lavar dos veces las células con PBS se añadió el anticuerpo secundario biotinilado, durante 30 minutos, al cabo de los cuales las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con estreptoavidina-peroxidasa, también 30 minutos, para posteriormente ser reveladas mediante la adición de diaminobenzidina (DAB). Las CMM obtenidas se caracterizaron inmunohistoquímicamente por ser positivas a CD105, CD73 y vimentina, y negativas a CD34, CD45, CD3, CD14, CD19, CD38 y glicoforina A.

Marcaje de células en apoptosis en la médula espinal lesionada

En todos los casos, se estudiaron cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina para evaluar los cambios del tejido en los diferentes tiempos tras la lesión. Se identificaron las células en proceso de apoptosis mediante el marcaje con apostain (anticuerpo monoclonal anti-ssDNA, F7-26, Apostain 1:100, Alexis Biochemicals Corporación, USA). Se utilizaron controles negativos de inmunotinción, empleando suero normal de conejo como anticuerpo primario en el procedimiento habitual de tinción inmunohistoquímica.

Contaje celular y estudios estadísticos

La zona de la lesión estudiada histológicamente de cada animal correspondió a un fragmento aproximadamente de 5 mm de longitud. Se seleccionaron doce cortes histológicos de la zona de contusión, separados aproximadamente 0,5 mm de cada muestra, y se cuantificó el número y la distribución de las células con positividad a «apostain» y con características morfológicas de neuronas o células gliales con un morfómetro de imagen (Optimas 6.2, Bothell, WA, USA). El número de células apostain-positivas (neuronas y glia) en cada animal se expresó como la media del conteo en el total de los cortes histológicos y su desviación estándar. El promedio de valores en los 10 animales de cada grupo experimental fue estimado como número total de células nerviosas en apoptosis. La morfología de las células madre administradas se consideró suficiente para poder eliminar del recuento las células madre marcadas con apostain. Tampoco se contabilizaron como células algunas células inflamatorias, que expresaban el marcador de apoptosis.

Se comparó el número de células nerviosas (neuronas y glia) apostain-positivas en cortes trasversales de los dos grupos experimentales, usando el método de la *t* de Student, y con ayuda del sistema InStat (v 1.01, software de GraphPad Inc., San Diego CA, EEUU), considerándose un valor de $p < 0,05$ como índice de significación estadística.

Resultados

En los animales tratados se observaron las células madre administradas, tanto a las 8 como a las 72 horas, formando acúmulos entre las microhemorragias y las zonas iniciales de necrosis tisular (Figura 1). Su morfología, en estos estadios iniciales tras su administración era característica y permitió descartar para el recuento estas células cuando se encontraron con marcaje nuclear de apostain.

En los animales del grupo control, a las 8 horas después del trauma, ya podían identificarse áreas de necrosis, principalmente en la sustancia gris, junto a focos de hemorra-

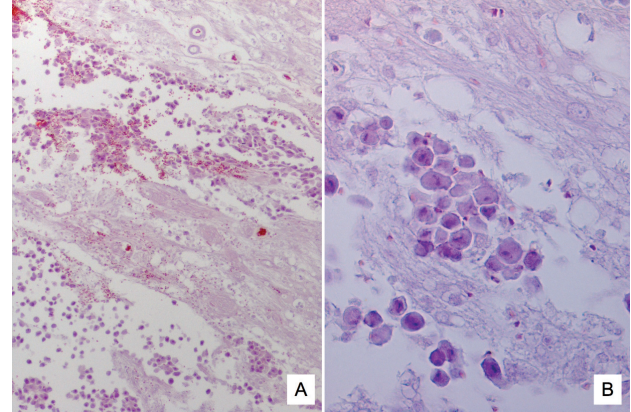


Fig. 1. a) Células madre mesenquimales, en la zona de implante, 6 horas después de la administración intratecal y a las 8 horas de la lesión traumática (HE x 40). b) Grupo de células madre mesenquimales, 6 horas tras su administración intratecal (HE x 100).

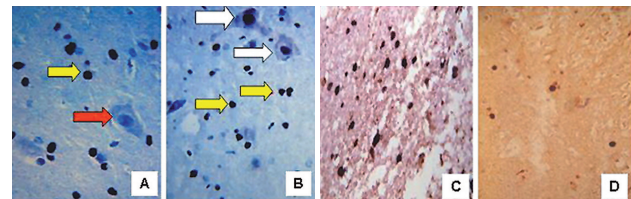


Fig. 2. a, b) Células nerviosas expresando apostain, a las 8 horas de la lesión. Grupo de animales control (flechas amarillas señalan núcleos marcados correspondientes a células gliales. Flechas blancas muestran neuronas con positividad nuclear a Apostain. Flecha roja muestra una neurona con tinción negativa a Apostain). c, d) Zona de transición entre sustancia gris y sustancia blanca, con núcleos celulares de aspecto glial y positivos a apostain, a las 72 horas de la lesión. El número de células en apoptosis es claramente superior en animales del grupo control respecto de los animales que recibieron células madre mesenquimales (tinciones inmunohistoquímicas para ver expresión de apostain, x 100).

gia. Las técnicas de inmunohistoquímica mostraron neuronas y células gliales, sobre todo astrocitos, marcadas con apostain (Figura 2). Los estudios de morfometría mostraron como valor medio de las determinaciones, un número de células nerviosas apostain-positivas de 138 ± 16 .

A las 72 horas, las hemorragias estaban prácticamente ausentes en el tejido medular. Sin embargo, las imágenes de degeneración del tejido en las regiones centrales y posteriores de la médula espinal eran evidentes y se observó la formación de cavidades por necrosis y signos de edema tisular severo, con alteraciones morfológicas en los axones de la sustancia blanca. La expresión de apostain se limitó prácticamente a la sustancia blanca, afectando a células de aspecto glial, aunque en

la sustancia gris se observaron algunas neuronas apostain-positivas. La morfometría en este momento mostró un número de células apostain-positivas de 82 ± 13 .

En el caso de los animales tratados con células madre mesenquimales se recogió una media de células nerviosas que expresaban apostain, de 76 ± 11 , a las 8 horas de la lesión, y de 57 ± 7 , a las 72 horas de la lesión (Figura 2). La Figura 3 muestra los valores medios de células nerviosas marcadas con apostain en los dos grupos experimentales, a las 8 horas y 72 horas tras la lesión traumática. En ambos tiempos evolutivos, el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los dos grupos experimentales ($p < 0,05$).

Discusión

La regulación de la apoptosis es objeto de numerosas investigaciones. Las dos vías de la apoptosis (dependiente e independiente de caspasas) están reguladas por una familia de proteínas que se clasifican en proapoptóticas (Bax, Bcl-xs, Bad, Bid, entre otras) y anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL y McI-1L) o de pro-supervivencia, según favorezcan o impidan la apoptosis. Además, la apoptosis también se regula a través de las vías de traducción de señal intracelulares, tales como la activación de la vía de la protein-kinasa B (PKB) inducida por factor de crecimiento, que puede inhibir la apoptosis directamente a través de la fosforilación e inactivación de las proteínas Bad (proapoptóticas) y de las caspasas 8 y 9.

Apostain es un marcador precoz de apoptosis, que permite diferenciar entre este proceso y el proceso de necrosis celular, lo que puede ser problemático con otros marcadores

de apoptosis generalmente utilizados [18]. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la presencia de células madre adultas mesenquimales, obtenidas del estroma de médula ósea, ejercen un efecto neuroprotector local, disminuyendo el número de células nerviosas que inician el proceso de apoptosis. Estos hallazgos apoyan observaciones previas que sugieren un efecto local antiapoptótico de las células madre adultas mesenquimales en la cardiomiopatía diabética [17, 19] o en órganos hematopoyéticos [20, 21], posiblemente a través de una regulación de bcl-2/bax, o inhibiendo la expresión de caspasa-3 [17, 19, 22]. Por otra parte, la observación de que el efecto antiapoptótico de las células madre mesenquimales se inhibe bloqueando la IL-6 [23] sugiere que esta citoquina, liberada por las células madre mesenquimales podría ser uno de los factores más importantes a la hora de explicar su mecanismo citoprotector [24].

En nuestro estudio hemos confirmado que existe un importante patrón de apoptosis en las fases precoces tras un trauma severo de la médula espinal, y hemos estudiado este proceso a las 8 horas porque es en ese momento cuando existe el mayor número de células en apoptosis [25-28]. Como resultado del análisis de nuestros dos grupos experimentales hemos podido encontrar evidencias a favor de que en el momento de máxima expresión de apoptosis postraumática, a las 8 horas de la lesión, existe una disminución en el número de células nerviosas en apoptosis, en el grupo de animales en los que se trasplantaron localmente las células madre estromales de médula ósea, lo que sugiere que estas células ejercen un efecto neuroprotector, capaz de disminuir los daños tisulares secundarios tras el traumatismo. Aunque es posible que en nuestro material la caracterización de las células marcadas con apostain nos haya llevado a interpretar erróneamente como neuronas a algunas células madre transplantadas en proceso inicial de apoptosis, la escasa diferenciación morfológica de estas células en las horas que siguen a su administración intralesional, permite, la mayor parte de las veces, su correcta identificación. Por otra parte, nuestro objetivo fue estudiar un posible efecto antiapoptótico de las células madre mesenquimales, sin entrar a considerar si dicho efecto es más importante sobre células de glía o sobre neuronas. Nuestros resultados muestran que tanto el número de células marcadas e identificadas, ya sea como neuronas o como células gliales, disminuye en el grupo de animales tratados, sin que sea fácil hacer un estudio comparativo del efecto antiapoptótico sobre los diferentes tipos de células nerviosas (neuronas o glia) por el hecho de que ya en las fases precoces tras el traumatismo existe una necrosis centromedular que afecta preferentemente a la sus-

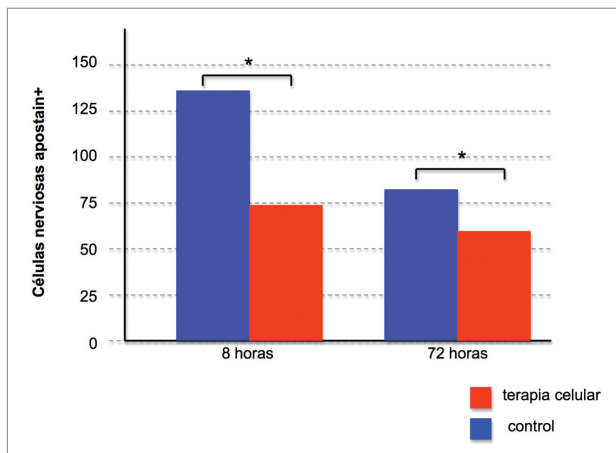


Fig. 3. Número de células nerviosas en apoptosis (apostain +) en el grupo de animales control y en el grupo de animales tratados mediante la administración intralesional de células madre mesenquimales (* $p < 0,05$).



tancia gris e impide la preservación de suficiente número de neuronas para hacer estudios fiables del número real de neuronas marcadas. Además, parece lógico que el número de células en apoptosis sea menor a las 72 horas de la lesión [25-28], ya que en esta fase se han extendido las zonas de necrosis tisular, lo que determina que en la mayor parte de las muestras exista una pérdida de tejido sobre el cual poder hacer las determinaciones inmunohistoquímicas. A pesar de ello, el estudio morfológico realizado, tanto a las 8 horas como a las 72 horas tras la lesión traumática medular, muestra que existe una disminución significativa en el número de células nerviosas que muestran apoptosis, cuando se compara el grupo de animales tratados mediante la administración intralesional de células madre mesenquimales respecto del grupo de animales que recibieron sólo suero fisiológico en la zona de lesión.

Nuestros hallazgos sugieren que existe un efecto neuroprotector de las células madre mesenquimales en una fase precoz tras la terapia celular reduciendo los fenómenos de apoptosis postraumática. Este efecto beneficioso se puede añadir a un posible efecto neurotrófico directo, condicionante de neurogénesis en el tejido huésped [29]. En cualquier caso, los hallazgos apoyan el efecto neuroprotector de las células madre adultas mesenquimales en las fases precoces de una lesión traumática severa y pueden ser un argumento para la aplicación de este tipo de terapia celular en las fases precoces tras lesiones traumáticas cerebrales o medulares. **I**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14:126-30.
- McCall JM, Braughler JM, Hall ED. Lipid peroxidation and the role of oxygen radicals in CNS injury. *Acta Anaesthesiol Belg* 1987; 38:373-9.
- Panter SS, Yum SW, Faden AI. Alteration in extracellular amino acids after traumatic spinal cord injury. *Ann Neurol* 1990; 27:96-9.
- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1994; 267:1449-56.
- Fenton RF, Hixon JA, Wright PW, Brooks AD, Sayers TJ. Inhibition of Fas (CD95) expression and Fas-mediated apoptosis by oncogenic ras. *Cancer Res* 1998; 58:3391-400.
- Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Tsuchiya K, Niwa M, Tsutsumishita Y, et al. Roles of nitric oxide in compression injury of rat spinal cord. *Free Radical Bio Med* 1996; 20:1-9.
- Rieger J, Standler M, Loschann PA, Heneka M, Weller M. Synthesis and biological effects of NO in malignant glioma cells: modulation by cytokines including CD95L, and TGF-beta, dexamethasone and p53 gene transfer. *Oncogene* 1998; 17: 2323-32.
- Choi C, Park JY, Lee J, Lim JH, Shin EC, Ahn YS, Kim et al. Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF-alpha, or IFN-gamma. *J Immunol* 1999; 162:1889-95.
- Akdemir O, Berksoy I, Karaoglan A, Barut S, Bilguvar K, Cirakoglu B et al. Therapeutic efficacy of Ac-DMQD-CHO, a caspase 3 inhibitor, for rat spinal cord injury. *J Clin Neurosci* 2008; 15: 672-8.
- Emery E, Aldana P, Bunge MB, Puckett W, Srinivasan A, Keane RW, et al. Apoptosis after traumatic human spinal cord. *J Neurosurg* 1998; 89: 911-20.
- Crowe MJ, Shuman SL, Masters JN, Bresnahan JC, Beattie MS. Morphological evidence suggesting apoptotic nuclei in spinal cord injury. *Soc Neurosci Abstr* 1995; 21:232.
- Katoh K, Ikata T, Katoh S, Hamada Y, Nakauchi K, Sano T, et al. Induction and its spread of apoptosis in rat spinal cord after mechanical trauma. *Neurosci Letters* 1996; 216: 9-12.
- Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nature Medicine* 1997; 3:73-6.
- Li GL, Brodin G, Farroque M, Funa K, Holtz A, Wang WL, et al. Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 280-9.
- Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang J, Mc Donald JW, et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 1995; 17:5395-406.
- Lou J, Lenke LG, Ludwig FJ, O'Brien MF. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord* 1998; 36:683-90.
- Qu H, Guo YH, Zhu XJ, Gao W, Mao JM. Antiapoptotic effects of mesenchymal stem cells on cardiac myocytes: in vitro study with rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007; 23:271-4.
- Rink A., Fung KM, Trojanowski JQ, Lee VM, Neugebauer E, McIntosh TK. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am J Pathol* 1995; 147:1575-83.
- Li JH, Zhang N, Wang JA. Improved anti-apoptotic and anti-remodeling potency of bone marrow mesenchymal stem cells by anoxic pre-conditioning in diabetic cardiomyopathy. *J Endocrinol Invest.* 2008; 31:103-10.
- Hu KX, Zhao SF, Guo M, Ai HS. Effects of mesenchymal stem cells on cell cycle and apoptosis of hematopoietic tissue cells in irradiated mice. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2007; 15:1226-30.
- Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit



- neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 2008; 26: 151-62.
22. Tang T, Hu JG, Yang JF, Zhou XM, Yang YF, Yin BL, et al. Effect of mesenchymal stem cells transplantation on the apoptosis after rat myocardial infarction. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2004; 29:274-8.
23. Xu G, Zhang Y, Zhang L, Ren G, Shi Y. The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361:745-50.
24. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; 98:1076-84.
25. Zurita M, Vaquero J, Zurita I. Presence and significance of CD-95 (FAS/APO1) expression after spinal cord injury. *J Neurosurg (Spine 2)* 2001; 94:257-64.
26. Zurita M, Vaquero J, Oya S, Morales C. Effects of dexamethasone on apoptosis-related cell death after spinal cord injury. *J Neurosurg (Spine 1)* 2002; 96:83-9.
27. Vaquero J, Zurita M, Oya S. Estudio de la apoptosis oligodendroglial tras un traumatismo de la médula espinal y su modificación tras la administración de metilprednisolona. *Mapfre-Medicina* 2004; 15:91-100.
28. Vaquero J, Zurita M, Oya S, Aguayo C, Bonilla C. Early administration of methylprednisolone decreases apoptotic cell death after spinal cord injury. *Histol Histopath* 2006; 21:1091-102.
29. Vaquero J, Zurita M. Bone marrow stromal cells for spinal cord repair: a challenge for contemporary neurobiology. *Histol Histopath* 2009; 24:107-16.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.