

Utilización de células madre mesenquimales del estroma de la médula ósea para el tratamiento de la paraplejía traumática experimental

Use of mesenchymal bone marrow stromal cells for the treatment of experimental traumatic paraplegia

Unidad de Investigación Neurociencias
de la Fundación Mapfre-Medicina.
Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid.

Vaquero J.
Zurita M.
Oya S.
Aguayo C.

RESUMEN

Teniendo en cuenta recientes observaciones experimentales acerca de la posible utilidad de las células madre adultas mesenquimales (CMM), obtenidas del estroma de la médula ósea, para el tratamiento de lesiones adquiridas del Sistema Nervioso Central, en el presente estudio hemos trasplantado 10^6 CMM en cavidades centromedulares postraumáticas de ratas Wistar adultas con una paraplejía crónicamente establecida, como consecuencia de un traumatismo medular severo. Los resultados obtenidos muestran clara y progresiva recuperación motora de los animales a partir de las dos semanas siguientes al trasplante. Los estudios histológicos realizados un mes después del tratamiento, sugieren que las células madre administradas se diferencian a neuronas y aportan factores tróficos capaces de inducir fenómenos de regeneración medular, posiblemente activando las células madre endógenas de la médula espinal traumatizada.

Palabras clave: Paraplejía, células madre, trasplante neural.

Vaquero J, Zurita M, Oya S, Aguayo C
Utilización de células madre mesenquimales del estroma de la médula ósea para el tratamiento de la paraplejía traumática experimental
Mapfre Medicina, 2005; 16: 115-121

ABSTRACT

Keeping in mind recent experimental observations about the possible utility of adult mesenchymal stem cells (CMM), obtained from the bone marrow stroma, for the treatment of acquired lesions of the Central Nervous System, in the present study we administered 10^6 CMM into postraumatic centromedullary cavities of adult Wistar rats suffering chronically established paraplegia. The obtained results showed clear and progressive motor recovery of the animals, starting from the two following weeks after this procedure. One month after the treatment, histological studies suggested that the administered mesenchymal stem cells differentiate to neurons and release trophic factors able to induce phenomena of spinal cord regeneration, activating the endogenous neural stem cells in the injured spinal cord tissue.

Key words: Paraplegia, stem cells, neural grafting.

Vaquero J, Zurita M, Oya S, Aguayo C
Use of mesenchymal bone marrow stromal cells for the treatment of experimental traumatic paraplegia
Mapfre Medicina, 2005; 16: 115-121

Correspondencia:

Jesús Vaquero
Hospital Puerta de Hierro.
28035-Madrid.
E-mail: jvaquero@telefonica.net

Fecha de recepción: 22 de febrero de 2005

Este trabajo ha sido realizado por medio de una Beca de Investigación de la Fundación MAPFRE-Medicina. 2004.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años existe un gran interés por el tema de las llamadas «células madre» y su posible potencial terapéutico para paliar determinadas enfermedades en el ser humano. Existen diferentes tipos de células madre. Las células madre embrionarias son las más pluripotenciales, con capacidad de proliferar *in vitro* manteniendo esa pluripotencialidad, y tienen además la posibilidad de diferenciarse hacia una gran variedad de líneas celulares. Sin embargo, es conocido que actualmente existen numerosos problemas éticos y legales para su utilización. Por ello, se han empezado a utilizar como alternativa para futuras aplicaciones terapéuticas las llamadas «células madre adultas», que parecen representar una opción muy prometedora, aunque la cuestión fundamental que deberá ser resuelta en los próximos años es conocer si realmente las células madre adultas pueden realizar la misma función que las células madre embrionarias.

Las células madre adultas pueden obtenerse de distintos tejidos, siendo uno de los más utilizados la médula ósea, cuyas células madre son capaces de diferenciarse a distintas líneas celulares, como son adipocitos, condrocitos, osteocitos, hepatocitos, células cardíacas o incluso neuronas. En este campo de investigación, la posibilidad de recuperar una función neurológica supuestamente irreversible representa un reto biológico y una indudable esperanza, ante la posibilidad de poder aplicar estas técnicas en un futuro inmediato al ser humano.

Recientemente, observaciones preliminares de diversos grupos de investigación, en la Universidad de Oakland (1) y en el Instituto Karolinska de Estocolmo (2) han demostrado la recuperación funcional de animales sometidos a una lesión medular traumática severa, tras el implante intralesional de una suspensión de células madre mesenquimales (CMM) adultas, obtenidas del estroma de médula ósea y cultivadas *in vitro*, pero en ambos casos los estudios se han realizado a la semana de la lesión medular y utilizando como animales control un grupo de animales que mostraban, en el periodo de tiempo estudiado, evidencias de recuperación funcional espontánea.

En el presente artículo mostramos nuestra experiencia con la utilización de CMM, obteni-

das del estroma de médula ósea, para el tratamiento de la paraplejía traumática establecida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las células madre

Para la obtención de CMM se utilizaron 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 (bajo campana de flujo laminar) la médula ósea fue extraída mediante lavado de los huesos con una jeringuilla del nº 26 cargada con 2cc 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 nylon de 70 micras. La suspensión celular obtenida fue sometida a una centrifugación en gradientes de densidad (Técnica de Ficoll-Hypaque) y posteriormente cultivadas en frascos de cultivo de 75 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. Posteriormente el cultivo se lavó con buffer fosfato salino (PBS) pH:7.4, añadiendo posteriormente 12 cc 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 8×10^3 células/cm² en presencia de 12cc de medio alfa-MEM/20%FBS con antibióticos y glutamina, a una concentración de 2mM.

Caracterización fenotípica de las CMM

Para caracterizar inmunohistoquímicamente las CMM obtenidas, éstas 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 desenmascaramiento 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. Posteriormente, tras lavar las células con PBS, se procedió a el 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 a las células 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, dejándolo actuar 30 minutos, al cabo de los cuales las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con streptoavidina-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, Glicoforina A y HLA.

Modelo de lesión medular

Para el presente estudio se han utilizado 30 ratas Wistar, hembras de 250-300 g de peso, que fueron anestesiadas con isoflurano y sometidas posteriormente a una laminectomía a nivel T6-T8. Tras la exposición de la médula espinal, se produjo una lesión medular traumática dejando caer, desde una altura de 20 cm, sobre la superficie dorsal de la médula expuesta, una barra de 12 mm² de sección y 25 g de peso. Esta barra fue guiada en su caída a través de un cilindro hueco, adaptado al área de la laminectomía y

permite realizar una lesión estandarizada que se define como el producto del peso de la barra por la altura desde la cual se deja ésta caer. En todos los animales experimentales se observó una paraplejía inmediata tras el impacto traumático. En este modelo experimental, tras la lesión traumática se observa de forma característica una necrosis centromedular que puede afectar entre 1 y 2 segmentos medulares. Esta cavidad es perfectamente visible en todos los casos a la semana del traumatismo y se asocia a una paraplejía irreversible en la rata Wistar.

Cuidados postoperatorios y técnica del implante intralesional de CMM

Los cuidados postoperatorios de los animales traumatizados consistieron en el vaciamiento vesical cada 8 horas por presión manual, administración de Ringer lactato intraperitoneal para evitar la deshidratación, administración de gentamicina (0.8 mg/100 g, intraperitoneal) durante una semana, e inspección visual diaria de la piel para detectar y tratar la aparición de úlceras por decúbito. Tres meses después de la lesión, mediante estudios de Resonancia Magnética se identificó, en los animales parapléjicos, la localización y extensión de la cavidad centromedular. Mediante técnicas de microcirugía, en 20 de estos animales, la cavidad fue rellenada bajo el microscopio quirúrgico con una suspensión de CMM. Para obtener el material donante para el implante, cultivos correspondientes a un cultivo primario de CMM o a un primer pase (P₁) fueron tratados con 10 microgramos/ml de bisbenzimidazol (Hoechst 33342) (3) durante 30 minutos a 37°C y levantados 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 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/sin FBS y sometido a recuento mediante el test de viabilidad de azul tripán. La suspensión celular obtenida se resuspendió en 500 microlitros de medio alfa-MEM sin FBS y fue sometida a recuento celular en una cámara de Neubauer mediante el test de azul tripán.

En los animales parapléjicos, tras ser anestesiados con isoflurano, fue expuesta la médula espinal, a nivel del impacto traumático previo, mediante microcirugía, para colocar el implante. Las CMM fueron inyectadas mediante un microinyector en las cavidades traumáticas centro-medulares de los animales parapléjicos, a una concentración final de 10^6 CMM por cada animal. Después del implante, el punto de inyección fue sellado con gel de fibrina y sobre la zona fue colocada una lámina de politetrafluoruro de etileno, para prevenir la formación de cicatrices conjuntivas. La musculatura paraespinal y el tejido subcutáneo se cerró con una sutura reabsorbible de 3/0. En los 10 animales restantes (grupo control) se realizó el mismo procedimiento quirúrgico para exponer quirúrgicamente la cavidad centromedular, pero inyectando el mismo volumen de medio alfa-MEM. Todos los animales (transplantados y controles) fueron sometidos diariamente a técnicas de rehabilitación consistentes en la movilización pasiva durante 15 minutos de las extremidades inferiores desde la primera semana después de la lesión. Semanalmente tras la lesión medular, todos los animales fueron periódicamente evaluados para comprobar su recuperación motora usando la escala BBB (4). Esta valoración fue llevada a cabo por dos investigadores que no conocían el grupo experimental al que pertenecían los animales a valorar.

Un mes después de la segunda cirugía, todos los animales fueron sacrificados mediante anestesia intraperitoneal y posterior perfusión intracardiaca con suero salino heparinizado al 0.9 %, seguido de la administración de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato salino, 0.1M, pH 7.4. Se recogieron muestras del tejido medular, tanto del área de lesión como de las zonas vecinas, siendo procesadas inmediatamente para llevar a cabo estudios histológicos convencionales mediante inclusión en parafina y posterior tinción con hematoxilina-eosina. Algunos cortes fueron procesados para estudiar inmunohistoquímicamente la posible expresión de Nestina (Chemicon Int. Inc. Temecula CA) y proteína de Neurofilamentos (NF-200, Serotec, Kidlington). En tres de los animales con implante de CMM, la muestra de tejido medular se fijó en paraformaldehído al 4% tamponado y luego fue bañada en un buffer sacarosa al 30% para proteger las células de la criofractura. Los cortes en congelación realizados a 5 micrómetros sobre estas piezas fueron utilizados para la visualización de las CMM

previamente marcadas con bisbenzimidida. En el presente estudio, el manejo de los animales obedeció en todo momento a lo estipulado por la legislación vigente respecto al uso y cuidados de los animales de laboratorio.

RESULTADOS

Con el modelo experimental de lesión traumática medular utilizado, todos los animales experimentan una paraplejía completa tras la contusión. Aproximadamente 1 semana después del trauma comienza a objetivarse una importante atrofia de miembros posteriores. En el presente estudio, todos los animales sometidos a la lesión traumática medular mostraron una paraplejía completa en el transcurso de los 3 meses siguientes a la lesión, momento en que se consideró que estábamos ante una paraplejía crónica irreversible, procediéndose entonces a la segunda intervención para el trasplante de CMM o de solo medio alfa-MEM. La valoración motora de los animales que recibieron el trasplante de CMM comenzó a modificarse a partir de las 2 semanas, con clara diferencia a partir de la tercera semana respecto del grupo de animales que solo recibieron inyección intramedular de medio alfa-MEM, los cuales permanecieron sin ningún tipo de recuperación motora. Los animales con trasplante de CMM se dejaron evolucionar durante un mes, antes de su sacrificio, momento en que alcanzaron un valor medio de 9 en la escala BBB, permaneciendo sin ningún tipo de recuperación motora todos los animales que no recibieron CMM (Figura 1).

Cuando se analizaron las modificaciones histológicas en el sitio del trasplante, en los animales a los que no se administró CMM se apreció una típica lesión quística centromedular, secundaria a una necrosis postraumática. Sin embargo, en los animales que recibieron el trasplante de CMM se observó una tabicación de la cavidad centromedular por bridas de tejido (Figura 2) entre las que se identificaban células de aspecto redondeado, marcadas por la bisbenzimidida y por lo tanto, identificables como CMM (Figura 3). Algunas de estas células mostraban positividad a proteína de neurofilamentos (Figura 4A). En las zonas más periféricas de la lesión centromedular se observaron acúmulos de células de apariencia ependimaria, con positividad a nestina (Figura 4B).

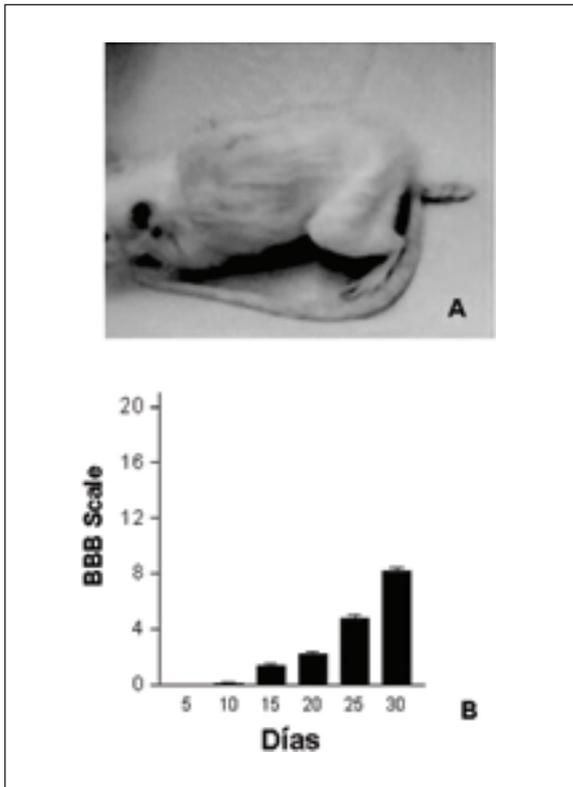


Figura 1. Gráfica que muestra la recuperación motora en el grupo de animales previamente parapléjicos que recibieron una inyección intramedular de 10^6 células madre mesenquimales (CMM), obtenidas del estroma de la médula ósea. Escala de BBB, de situación funcional motora, con un valor máximo de 21 puntos. En A se muestra la postura espontánea de algunos de los animales, con flexión espontánea de las patas posteriores y apoyo sobre ellas.

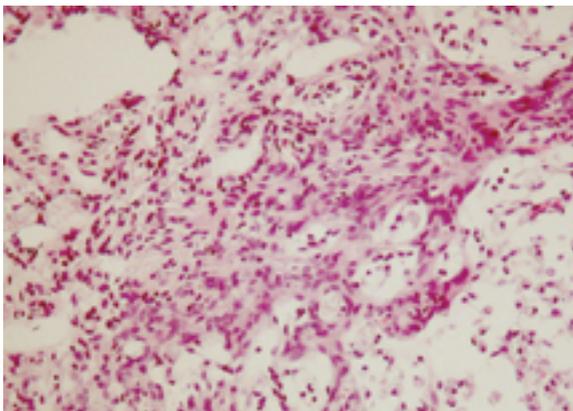


Figura 2. Aspecto histológico de la cavidad centromedular, un mes tras la administración local de CMM. Se observan tractos de tejido neoformado, rellenando parcialmente la cavidad centromedular postraumática. (H.E., x 100)

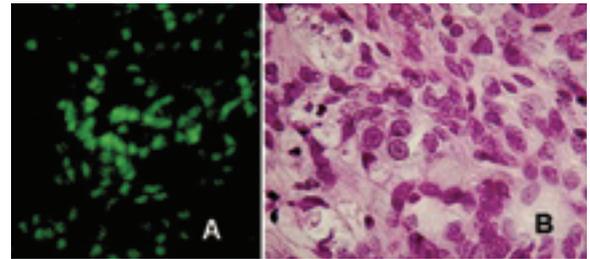


Figura 3. A: Identificación, con el microscopio de fluorescencia, de las CMM marcadas con bisbenzimidá, en el interior de la cavidad intramedular postraumática, un mes después del trasplante (x 100). B: Aspecto de las CMM administradas en la cavidad centromedular. Algunas células muestran un mayor tamaño, lo que sugiere una posible diferenciación (H.E., x 200).

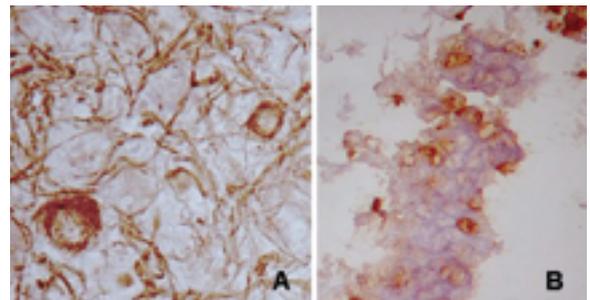


Figura 3. Imágenes inmunohistoquímicas obtenidas de zonas correspondientes a la cavidad centromedular postraumática, un mes después de la administración local de CMM. A: Identificación de células con diferenciación neuronal, identificadas por su marcaje con Proteína de Neurofilamentos (NF), rodeadas por fibras nerviosas que también muestran marcaje con NF (x 200). B: Células ependimarias, expresando nestina (x 200).

DISCUSIÓN

Los resultados descritos muestran que los animales con una paraplejía crónica postraumática experimentan una clara recuperación motora, de forma precoz tras el implante intralesional de una suspensión de células madre mesenquimales. Esta recuperación parece ser progresiva, aunque en el presente estudio los animales se dejaron evolucionar tan solo un mes tras el trasplante, al objeto de conocer las modificaciones histológicas relacionables con el inicio de dicha recuperación funcional.

Los estudios morfológicos de los animales que recibieron el trasplante de CMM mostraron

una tendencia a la ocupación de la zona quística centromedular por bridas de fibras y células. Esta población celular estaba constituida, al menos en parte, por las células trasplantadas, cuya identificación pudo ser hecha con el microscopio de fluorescencia, por su marcaje previo con bisbenzimidida.

El principal problema que surge ante estos resultados es conocer los mecanismos por los cuales se produce la recuperación funcional de los animales que recibieron el trasplante de CMM. Una de las posibilidades es que las células implantadas se integran en el tejido huésped de la médula espinal reemplazando las estructuras tisulares previamente dañadas. Sin embargo, no existen claras evidencias de este hecho, sobre todo en el intervalo de tiempo estudiado, ya que la importante recuperación funcional observada no parece estar relacionada con un relleno significativo de la cavidad centromedular que pudiera actuar como un puente activo. Una hipótesis más razonable, ya señalada por Chopp y cols. (1) para explicar los efectos de esta terapia en animales sometidos a una lesión traumática medular no severa, y por tanto causante de paraplejía transitoria, es que tal vez las CMM expresan factores de regeneración o activan mecanismos compensadores, e incluso la proliferación de células madre endógenas de la médula traumatizada. Esta posibilidad parece verse apoyada por nuestras observaciones de una proliferación de células endimarias, actualmente consideradas como las principales células madre endógenas de la médula espinal (5). La expresión de nestina en estas células sugiere un efecto neurotrófico de las CMM activando estas células madre neurales en la médula espinal lesionada.

Desde el punto de vista de posible aplicación clínica de estos estudios, parece interesante el hecho de que hemos confirmado la eficacia experimental de esta técnica en la paraplejía crónicamente establecida y por tanto, realizando el trasplante de forma diferida respecto del momento en que tuvo lugar la lesión medular traumática. La presente serie experimental confirma observaciones previas de nuestro laboratorio, realizadas con un menor número de animales y con unos resultados totalmente superponibles a los obtenidos en el presente estudio. Es obvio que la aplicación a humanos de estas técnicas exige un tratamiento diferido, ante la posibilidad de que en las semanas siguientes al traumatis-

mo medular se aprecien, de forma espontánea y tras remitir el edema acompañante a una posible lesión incompleta, signos de recuperación funcional.

En el caso de utilización clínica de la técnica, parece evidente que se trata de un procedimiento sencillo, sin los riesgos y complicaciones inherentes a las técnicas de trasplante intramedular de tejido nervioso fetal (6-8), ya que sería posible la utilización de células autólogas, obtenidas por punción de médula ósea del propio paciente parapléjico y por lo tanto no sería necesario inmunosupresión tras el procedimiento. Con las técnicas de neuroimagen actualmente disponibles, parece factible, además, proceder al implante de CMM en las cavidades centromedulares por medio de punción percutánea, lo que podría facilitar la metodología del trasplante.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que el efecto de recuperación funcional se logra tras el implante de células sin diferenciación, tal vez porque su mecanismo de actuación sea la liberación de factores tróficos capaces de activar los mecanismos de reparación endógena medular, aunque existen evidencias morfológicas de que las células trasplantadas se pueden diferenciar a neuronas *in vivo*, tras el trasplante, tal vez como consecuencia de un entorno tisular adecuado. En cualquier caso, la posibilidad de una diferenciación neuronal *in vivo* de CMM, parece lógica ante el hecho de que estas células pueden transdiferenciarse cuando son tratadas *in vitro* con inductores químicos, del tipo del mercaptoetanol o por medio de un co-cultivo con células de Schwann. Nuestros resultados apoyan el fenómeno de transdiferenciación neuronal de las CMM obtenidas del estroma de médula ósea, siendo necesario conocer en un futuro inmediato si el trasplante de células madre transdiferenciadas ofrece ventajas respecto del trasplante de CMM no diferenciadas, como se ha realizado en el presente estudio experimental.

Independientemente de estas consideraciones, parece obvio que se requieren nuevos estudios para conocer no solo los efectos a largo plazo del implante intralesional de células madre mesenquimales en la paraplejía traumática, sino igualmente para conocer los mecanismos por los cuales parece lograrse, de forma rápida y progresiva, la recuperación motora de los animales parapléjicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. CHOPP M, ZHANG X H, LIY, WANG L, CHEN J, LU D, ROSENBLUM M. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuro Report*. 2000; 11: 3001-3005.
2. HOFSTETTER C P, SCHWARZ E J, HESS D, WIDENFALK J, EL MANIRA A, PROCKOP D J, OLSON L. Marrow estromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 2199-2204.
3. BARON-VAN EVERCOOREN A, GANSMÜLLER A, CLERIN E, GUMPEL M. Hoechst 33342, a suitable fluorescent marker for Schwann cells after transplantation in the mouse spinal cord. *Neurosc Lett*. 1991; 131: 241-244.
4. BASSO D M, BEATTIE M S, BRENNAHAN J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995; 12: 1-21.
5. JOHANSSON C, MOMMA S, CLARK D, RISLING M, LENDAHL U, FRISEN J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 1999; 96: 25-34.
6. WIRTH III E D, REIER P J, FESSLER R G, THOMPSON F J, UTHMAN B, BEHRMAN A, BEARD J, VIERCK C J, ANDERSON D K. Feasibility and safety of neural tissue transplantation in patients with syringomyelia. *J Neurotrauma*. 2001; 18: 911-929.
7. ZURITA M, VAQUERO J, OYA S. Grafting of neural tissue in chronically injured spinal cord: influence of the donor tissue on regenerative activity. *Surg Neurol*. 2000; 54: 117-125.
8. ZURITA M, VAQUERO J, OYA S, MONTILLA J: Functional recovery in chronic paraplegic rats after co-grafts of fetal brain and adult peripheral nerve tissue. *Surg Neurol*. 2001; 55: 249-254.