

Implicación de factores neurotróficos en la transdiferenciación neuronal de células madre mesenquimales adultas

Implication of neurotrophic factors in the neuronal transdifferentiation of adult mesenchymal stem cells

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

Unidad de Investigación Neurociencias
de la FUNDACION MAPFRE
Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid

RESUMEN

Introducción: En los últimos años se están recogiendo evidencias a favor de que, en determinadas condiciones experimentales, pueda tener lugar un proceso de transdiferenciación de células madre (CM) adultas mesenquimales hacia células nerviosas. La observación de que la presencia de células de Schwann produce la transdiferenciación neuronal de CM mesenquimales obtenidas del estroma de la médula ósea ha motivado la realización del presente estudio, con la finalidad de conocer la implicación de factores neurotróficos en el proceso de diferenciación neuronal de estas células.

Material y métodos: En este trabajo hemos cultivado CM mesenquimales adultas, del estroma de médula ósea, añadiendo al medio de cultivo Factor neurotrófico recombinante derivado de cerebro (BDNF, 10 ng/ml), Factor de crecimiento nervioso (NGF 7S, 10 ng/ml) y Ácido retinoico (5 µg/ml). El porcentaje de células que muestran morfología neuronal y expresan PNF (200 Kd) fue valorado a los 2, 7 y 14 días. A efectos comparativos se utilizaron datos de un estudio previo de transdiferenciación de CM por medio de beta-mercaptoetanol y por medio de su co-cultivo con células de Schwann.

Resultados: Los resultados mostraron que tanto el NGF como el BDNF, a las concentraciones utilizadas, son capaces de lograr transdiferenciación de las CM mesenquima-

ABSTRACT

Introduction: Recently has been reported that under certain experimental conditions, adult mesenchymal stem cells (SC) show neuronal transdifferentiation. The observation that the presence of Schwann cells promotes neuronal transdifferentiation of bone marrow stromal SC has motivated the realization of the present study, with the purpose of knowing the possible implication of neurotrophic factors in this process.

Material and methods: We have cultured adult mesenchymal SC obtained from the stroma of the bone marrow, adding to the cultures recombinant Brain derived neurotrophic factor (BDNF, 10 ng/ml), Nervous growth factor (NGF 7S, 10 ng/ml) and retinoic acid (5 µg/ml). The percentage of cells showing neuronal morphology and expressing Neurofilament protein, (NFP, 200 Kd) was valued after 2, 7 and 14 days, and these data were compared with the data obtained in a previous study carrying out SC transdifferentiation by beta-mercaptoethanol or culturing adult mesenchymal SC in presence of Schwann cells.

Results: The results show that NGF and BDNF are neurotrophic factors able to achieve neuronal transdifferentiation of adult mesenchymal SC, with a percentage of SC showing neuronal morphology similar to which is obtained using beta-mercaptoethanol or Schwann cells.

Correspondencia:

J. Vaquero. Servicio de Neurocirugía.
Hospital Puerta de Hierro.
San Martín de Porres 4. 28035-Madrid.
jvaquero@telefonica.net

Beca de investigación FUNDACIÓN MAPFRE, 2005.

les adultas hacia una morfología neuronal, con un porcentaje de CM transdiferenciadas, entre los 7 y 14 días de tratamiento, similar al que se obtiene cultivando CM en presencia de células de Schwann.

Conclusiones: Los hallazgos obtenidos sugieren que los fenómenos de transdiferenciación neuronal *in vivo*, cuando las CM mesenquimales adultas se implantan en el Sistema Nervioso, están principalmente mediados por factores neurotróficos locales, por lo que puede ser innecesario plantear una transdiferenciación neuronal *in vitro* de las CM adultas en protocolos de terapia celular para el tratamiento de lesiones neurológicas.

Palabras clave:

Células madre, Transdiferenciación neuronal, Factores neurotróficos.

Conclusions: These findings suggest that neuronal transdifferentiation obtained *in vivo*, when adult mesenchymal SC are implanted in the Nervous System, may be mainly related with the local presence of neurotrophic factors. Thus, is questionable the necessity of proceeding *in vitro* to a neuronal transdifferentiation of adult SC, as a previous step, when local administration of adult SC is considered for the treatment of System Nervous lesions.

Key words:

Stem cells, Neuronal transdifferentiation, Neurotrophic factors.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años existe un interés creciente por el potencial terapéutico de las células madre (CM). Aunque las CM embrionarias son las más pluripotenciales, su obtención conlleva múltiples problemas de tipo ético y legal, por lo que está cobrando cada vez mayor importancia el empleo de las CM adultas, las cuales pueden diferenciarse hacia diferentes tipos celulares, tanto *in vitro* como *in vivo* y se han mostrado igualmente útiles en protocolos experimentales de regeneración tisular. En el caso del Sistema Nervioso Central (SNC) adulto, existen células madre multipotenciales, generalmente identificables por su expresión de nestina, que además de originar células gliales, pueden ser una fuente de neuronas en la época postnatal (1). Estas células experimentan divisiones asimétricas, y las células hijas van a seguir rutas diferentes de diferenciación funcional, de modo que una de ellas se diferenciará en una neurona o en una célula glial (de astrogliá o de oligodendrogliá) y la otra quedará con las mismas características de las células progenitoras. Estas características de autorrenovación y pluripotencialidad definen a las CM de un órgano determinado. Hasta el momento se han encontrado CM neurales en la zona subventricular del cerebro, en el parénquima cortical y en la re-

gión endimaria de la médula espinal, identificándose estas últimas con las células endimarias (2). Sin embargo, la dificultad de obtener del cerebro CM adultas, limita su posible utilidad terapéutica.

Por otra parte, en la actualidad una de las fuentes más utilizadas para la obtención de CM adultas es el estroma de la médula ósea, las cuales se pueden expandir *in vitro* con relativa facilidad (índice de su capacidad proliferativa) y a la vez diferenciarse en múltiples tipos de células mesenquimales (adipocitos, condrocitos, osteocitos.....) o incluso en neuronas mediante un proceso que se define como de transdiferenciación, por cuanto que la célula mesenquimal daría así origen a células que normalmente tienen un origen embrionario diferente (neuroectodérmico). De hecho, en los últimos años se han acumulado evidencias a favor de que las CM mesenquimales adultas pueden sufrir fenómenos de transdiferenciación neuronal, tanto *in vitro* como *in vivo*. (3-6). Sin embargo, el hecho de que las CM mesenquimales adopten *in vitro* una morfología neuronal cuando se cultivan en presencia de agentes oxidantes, como el beta-mercaptoetanol, ha llevado a algunos autores a plantear si la morfología neuronal de las células así generadas no podría ser en realidad una simple modificación del citoesqueleto, como consecuencia de la pre-

Zurita M., Aguayo C.,
Oya S., et al.Implicación de factores neurotróficos en
la transdiferenciación neuronal de
células madre mesenquimales adultas

sencia de estos agentes químicos, y no un fenómeno de transdiferenciación funcional (7,8). Para resolver esta cuestión, hemos realizado estudios previos que demuestran cómo las células madre mesenquimales pueden adoptar una morfología claramente neuronal y expresar marcadores propios de una diferenciación hacia esta línea celular, cuando son cultivadas en presencia de células de Schwann (9). Esta observación pone de manifiesto una transdiferenciación biológica, posiblemente como resultado del aporte de factores neurotróficos por parte de las células de Schwann y deja sin fundamento la teoría de que la adopción de una forma neuronal, por parte de las CM mesenquimales, podría ser consecuencia de una citotoxicidad inducida por determinados agentes químicos. Al objeto de confirmar estos hallazgos, nos hemos planteado la utilización de factores neurotróficos de diferenciación celular, tales como el NGF, el BDNF y el ácido retinoico, al objeto de conocer la posible influencia de estos factores en el proceso de transdiferenciación neuronal de las CM mesenquimales adultas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de CM mesenquimales del estroma de la médula ósea

Para la obtención de las CM mesenquimales se utilizaron ratas 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 y aguja 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 gradiente de densidad (técnica de Ficoll-Hypaque). Tras la centrifugación, a 2500rpm durante 30 minutos, se recogió el so-

brenadante y la interfase, siendo éstos resuspendidos en medio alfa-DMEM/10%FBS con antibiótico. Las células fueron nuevamente centrifugadas a 1500 rpm durante 15 minutos y el precipitado fue resuspendido en 20 cc de medio alfa-MEM con 2mM de L-glutamina, un 20% de suero fetal bovino (FBS), 100u/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina, 5 µg/ml de gentamicina y sin deoxiribonucleótidos ni ribonucleótidos. Finalmente, las células fueron colocadas en un frasco de cultivo de 175 cm² e incubadas en una estufa a 37°C, con un 5% de CO₂. A las 48 horas de incubación, se retira el sobrenadante, que contiene restos celulares y células no adherentes, seleccionándose así las células adherentes. Posteriormente el cultivo fue lavado con buffer fosfato salino (PBS, pH:7,4) estéril, añadiendo posteriormente 20 cc de medio alfa-MEM completo, con 20% de FBS, que fue cambiado cada 2-3 días, durante 14 días.

Cuando las células alcanzaron un desarrollo cercano a la confluencia, fueron levantadas del frasco de cultivo mediante su incubación con 4 ml de tripsina 0,25%/1mM EDTA, durante 4-5 minutos a 37°C. Tras este periodo de incubación la tripsina fue inactivada con 8 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/10%FBS y sometido a recuento mediante el test de viabilidad de azul tripán. Tras el recuento, las CM fueron subcultivadas en frascos de 75 cm² en una concentración de 8000 células/cm², en presencia de 12cc de medio alfa-MEM/10%FBS con antibióticos y L-glutamina, a una concentración de 2mM.

Caracterización fenotípica de las CM mesenquimales

Para caracterizar inmunohistoquímicamente las CM obtenidas por el procedimiento descrito en el apartado anterior, 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 portas fueron lavados con buffer PBS y las células 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 bloquear los sitios no específicos mediante la incubación con suero no inmune de caballo al 8% durante 30 minutos. Sin lavar las muestras, solo retirando el exceso de suero no inmune, se les añadió el anticuerpo primario y se incubaron durante 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 fueron lavadas dos veces con PBS y se incubaron con streptoavidina-peroxidasa, también 30 minutos, para posteriormente ser reveladas mediante la adición de diaminobenzidina (DAB). Como resultado de estas técnicas se hizo la identificación fenotípica de las CM mesenquimales utilizadas en el presente estudio, siendo éstas positivas a los marcadores CD105, CD73, SH4 y Vimentina, y negativas a CD34, CD45, CD3, CD14, CD19 y CD38.

Tratamientos in vitro con factores neurotróficos

Los factores de crecimiento utilizados en el presente estudio para la transdiferenciación de las CM fueron: 1) Factor de crecimiento nervioso (NGF-7S) a una dosis de 10ng/ml; 2) Factor Nervioso derivado de cerebro (BDNF) a una dosis de 10ng/ml, y 3) Acido retinoico, a una dosis de 5µg/ml.

Las CM purificadas fueron sembradas en placas de cultivo a una densidad de 30.000 células por cada cm² de superficie, para proceder a los estudios de diferenciación con factores de crecimiento durante 7 y 14 días. El ritmo de diferenciación, evaluado por la expresión de marcadores neuronales y por la adopción de morfología neuronal, fue comparado con los parámetros obtenidos en un estudio previo, utilizando beta-mercaptoetanol (generalmente utilizado para lograr transdiferen-

ciación por métodos químicos) y utilizando un cocultivo de CM y células de Schwann (9). Para los estudios de diferenciación química, el medio de cultivo de las CM mesenquimales fue reemplazado por un medio de preinducción consistente en DMEM con 20% de FBS y 1mM de 2-beta-mercaptoetanol. A las 24 horas, tras eliminar el medio de preinducción, las células fueron lavadas dos veces con PBS y transferidas 48 horas a un medio de inducción compuesto por DMEM sin suero, con una concentración entre 5-10mM beta-mercaptoetanol. Para lograr la transdiferenciación biológica en presencia de células de Schwann, se realizaron cocultivos de CM y células de Schwann, en una proporción 1:1, según protocolos previamente descritos (9).

Caracterización inmunohistoquímica de las células madre transdiferenciadas

En el presente estudio, la caracterización inmunohistoquímica de la transdiferenciación neuronal se hizo por medio del marcaje de las células con Proteína de Neurofilamentos (PNF, 200 Kd; 1:500, Serotec, Kidlington, UK) utilizando la técnica ABC, para estudio con microscopía de luz convencional, o bien un anticuerpo secundario unido a fluoresceína, para estudio mediante el microscopio de fluorescencia.

Estudio estadístico

Al objeto de poder evaluar los resultados, se repitieron 5 veces los experimentos de diferenciación celular en cultivo, recogiendo los porcentajes aproximados de células que adoptaban morfología neuronal, a los 2, 7 y 14 días tras iniciar los diferentes tratamientos de diferenciación. La recogida de estos datos fue hecha por un observador (MZ) sin conocer el tipo de tratamiento aplicado a cada uno de los cultivos celulares. Los porcentajes medios (\pm desviación estándar) de las células de cada cultivo mostrando morfología neuronal, a los diferentes tiempos de evolución, fueron comparados utilizando el programa estadístico Prisma (Graph-Pad) y el test de ANOVA, realizándose el test de Mann-Whitney para comparación de resultados entre grupos. Se consideró significación estadística un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Tratamiento con NGF

El tratamiento, en cultivo, con NGF (7S) a bajas concentraciones (10ng/ml) es suficiente para provocar un cambio morfológico en las CM mesenquimales que adquieren una morfología típica neuronal. Entre las primeras 24-48 horas del tratamiento, aproximadamente el 30% de las células adquieren un aspecto neuronal, con expresión citoplasmática de marcadores de diferenciación neuronal (PNF, 200 Kd). A la semana, este porcentaje sube a un 60% y cuando se mantiene el cultivo durante 14 días, se aprecia que tras este tiempo, aproximadamente el 70% de las células muestran claros signos morfológicos e inmunohistoquímicos de diferenciación neuronal.

Tratamiento con BDNF

El tratamiento en cultivo de las CM mesenquimales con factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) a bajas concentraciones (10ng/ml) induce en estas células cambios morfológicos compatibles con la progresiva adquisición de un fenotipo neuronal. Dichos cambios suceden más precozmente que los encontrados en los tratamientos con NGF y así, a las 48 horas del tratamiento ya existe al menos un 40% de las células con una morfología neural pudiéndose observar una clara reducción del tamaño del cuerpo celular y la aparición de un gran número de prolongaciones. A la semana del tratamiento con BDNF, aproximadamente el 85% de las células en cultivo muestran un aspecto típico neuronal y este porcentaje permanece invariable a los 14 días de iniciarse el tratamiento. En el caso del tratamiento con BDNF, el cambio de morfología neuronal se acompañó, en todo momento, de la expresión inmunohistoquímica de PNF por las células del cultivo.

Tratamiento con ácido retinoico

Los resultados con el ácido retinoico no fueron tan espectaculares, desde el punto de vista morfológico, como los encontrados con el NGF y el BDNF. Tras el tratamiento con ácido retinoico, a

5 μ g/ml, a las 48 horas no se observan cambios morfológicos en las CM. A la semana del tratamiento se puede apreciar apenas un 15% de células que muestran leves prolongaciones celulares que recuerdan a las prolongaciones de las células nerviosas, pero sin llegar a formar los largos y numerosos procesos celulares que se pueden observar en las CM tratadas con NGF o BDNF. A pesar de estos cambios morfológicos, la expresión de PNF fue negativa o débilmente positiva en todas las CM tratadas. El porcentaje de CM que adoptan morfología neuronal sigue siendo alrededor del 15% a los 14 días de haberse iniciado el tratamiento con ácido retinoico, siendo negativo o poco concluyente el marcaje inmunohistoquímico con PNF.

La Figura 1 muestra algunos ejemplos de la diferenciación neuronal obtenida por medio de los

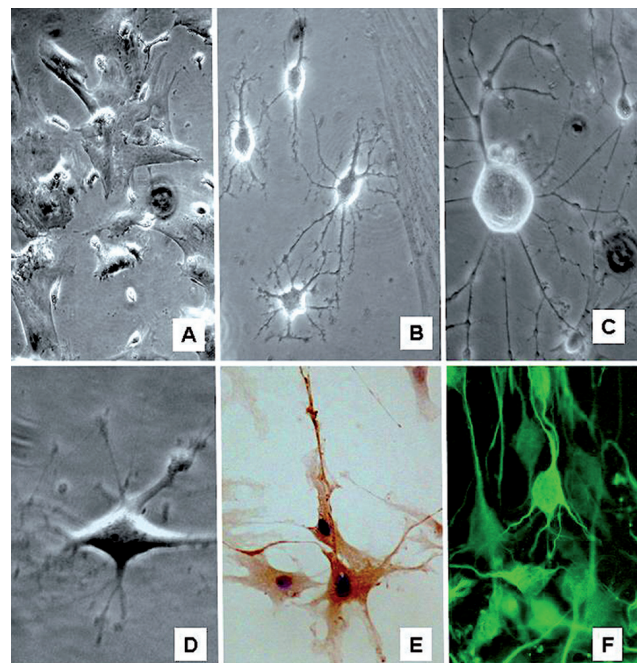


Fig. 1. Detalles de la transdiferenciación de células madre (CM) mesenquimales adultas hacia células de morfología neuronal. A: Imagen característica de las CM en cultivo. B y C: Aspecto morfológico de neuronas adultas, a los 14 días de tratamiento con NGF. D: Adopción de morfología neuronal de las CM a los 7 días de tratar el cultivo con BDNF. E: Imagen inmunohistoquímica, mostrando positividad a PNF en CM transdiferenciadas, tras 7 días de tratamiento con NGF. F: Imagen inmunohistoquímica (fluorescencia) mostrando CM transdiferenciadas, con morfología neuronal y fuerte expresión de PNF, a los 14 días de tratar las CM con BDNF.

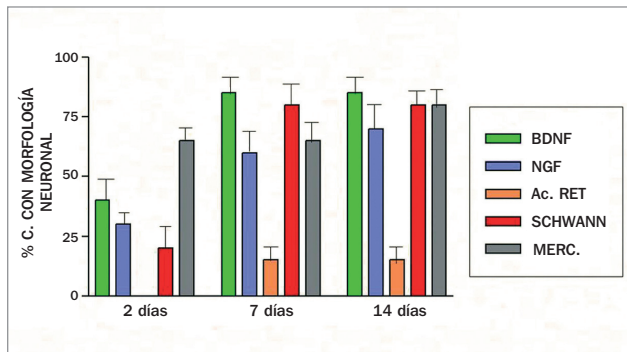


Fig. 2. Gráfica que muestra los porcentajes (\pm desviación estándar) de CM que se transdiferencian en cultivo, según los diferentes agentes neurotróficos utilizados en el presente estudio. Se muestran también, a efectos de comparación, los datos recogidos en experiencias previas utilizando beta-mercaptoetanol y un cocultivo con células de Schwann, para lograr la transdiferenciación neuronal de las CM. Los resultados representan los valores medios de 5 experiencias repetidas.

factores neurotróficos utilizados en el presente estudio y la Figura 2 muestra los porcentajes de CM transdiferenciadas en los distintos tiempos de evolución. En esta última Figura se incluyen, a efectos comparativos, los datos recogidos en experiencias previas de transdiferenciación química de CM, utilizando agentes oxidantes, del tipo del beta-mercaptoetanol, así como en experiencias de transdiferenciación biológica, cocultivando CM con células de Schwann (9). Utilizando beta-mercaptoetanol se obtiene un porcentaje de transdiferenciación de las CM mesenquimales, en torno al 65% de las células, a las 48 horas de iniciarse el tratamiento, siendo aproximadamente el mismo porcentaje a los 7 días y del 80% a los 14 días. Cuando se induce una transdiferenciación biológica, por la presencia de células de Schwann, el porcentaje aproximado de CM que muestran morfología neuronal es del 20% a las 48 horas y aproximadamente del 80% a los 7 y a los 14 días.

Desde el punto de vista de análisis estadístico de estos resultados, se apreció que tanto a los 7 como a los 14 días de iniciarse los diferentes tratamientos, tanto la diferenciación neuronal obtenida con el empleo de BDNF, NGF, beta-mercaptoetanol, o con cocultivos de células de Schwann es similar, sin apreciación de diferencias significativas ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

El hecho de que se puedan transdiferenciar las CM del estroma de la médula ósea hacia un fenotipo neuronal abre numerosas posibilidades para el tratamiento de enfermedades y lesiones del Sistema Nervioso. Las CM adultas presentan, además, numerosas ventajas respecto de las CM embrionarias, como son su facilidad de obtención y de empleo autólogo, en el mismo paciente.

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 CM adultas se implantan en zonas previamente lesionadas (4,6,10-12). Como consecuencia de ello, cabe plantearse que, a la hora de intentar una terapia celular para reparar lesiones neurológicas, no es necesario recurrir a procedimientos de manipulación de las CM 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 de diferenciación, presentes en el propio tejido nervioso. Si esto es así y de hecho se han obtenido evidencias de una clara transdiferenciación neuronal mediada por la presencia de células de Schwann, cabe preguntarse cuáles son los principales factores neurotróficos que inducen el fenómeno de transformación de las CM mesenquimales adultas, ya que la respuesta a este interrogante podría llevar a que pudiéramos acelerar o aumentar el proceso de transdiferenciación neuronal, en futuros protocolos de terapia celular aplicados al Sistema Nervioso. Teniendo en cuenta que tanto el NGF como el BDNF son factores liberados por la células de Schwann, nos ha parecido lógico estudiar la capacidad de estos factores neurotróficos para inducir la transdiferenciación neuronal de las CM mesenquimales adultas, lo que apoyaría nuestras observaciones previas que demuestran cómo la transdiferenciación es un hecho constante cuando las CM se cultivan en presencia de células de Schwann (9).

Nuestros resultados muestran que tanto el NGF como el BDNF tienen capacidad para lograr *in vitro* una transdiferenciación de las CM adultas mesenquimales, siendo esta capacidad

Zurita M., Aguayo C.,
Oya S., et al.

Implicación de factores neurotróficos en
la transdiferenciación neuronal de
células madre mesenquimales adultas

muy importante para el NGF y sobre todo para el BDNF, aunque tanto a los 7 días como a los 14 días, en el presente estudio no se ha obtenido diferencia estadísticamente significativa según que se utilizara uno u otro de estos compuestos. La elección del ácido retinoico para el presente estudio obedece al hecho de que esta sustancia tiene un efecto oxidante, similar al de otros compuestos, como el beta-mercaptoetanol, que se considera un importante agente químico capaz de lograr transdiferenciación de las CM adultas en cultivo. Por otra parte, se conoce que el ácido retinoico tiene un claro efecto madurativo sobre células nerviosas, por lo que teóricamente podría tener un papel en la diferenciación neuronal de las CM mesenquimales. Sin embargo, y de acuerdo con nuestros presentes resultados, el ácido retinoico, al menos a la concentración utilizada, no tiene apenas capacidad para lograr transdiferenciación neuronal de las CM mesenquimales, siendo poco concluyentes e inconstantes los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de marcadores de diferenciación neuronal.

Los resultados que hemos obtenido señalan que los resultados morfológicos de transdiferenciación logrados con NGF y BDNF son similares a los obtenidos cultivando CM mesenquimales adultas en presencia de células de Schwann, lo que apoya que el efecto de transdiferenciación biológica logrado por la presencia de células de Schwann puede estar mediado por la liberación de factores neurotróficos a partir de estas células.

En cuanto a la transdiferenciación lograda por beta-mercaptoetanol, se trata de un cambio mucho más rápido de la morfología celular, presente ya a los 2 días del tratamiento en más del 60 % de las CM mesenquimales, momento en que

la transdiferenciación biológica, ya sea por medio de células de Schwann o por factores derivados de ellas, es mucho menor. A los 7 y 14 días, el porcentaje de células transdiferenciadas biológicamente es similar al obtenido con beta-mercaptoetanol, sin que podamos conocer, con los parámetros de estudio utilizados, si con posterioridad a este momento se mantiene el porcentaje de células con morfología neuronal, según que se emplee una u otra técnica de transdiferenciación.

En cualquier caso, nuestros presentes resultados muestran que factores neurotróficos como el NGF y el BDNF, utilizados a bajas concentraciones, son capaces de transdiferenciar las CM mesenquimales adultas hacia una morfología neuronal y teniendo en cuenta que estos dos factores pueden ser liberados por la célula de Schwann (13-15), es lógico admitir su implicación en los fenómenos de transdiferenciación celular que tienen lugar in vivo cuando las CM mesenquimales se llevan al Sistema Nervioso. El hecho, además, de que se haya demostrado transdiferenciación neuronal in vivo de las CM cuando se trasplantan a zonas de lesión del Sistema Nervioso Central (10) donde no existen células de Schwann, permite sospechar que el BDNF y posiblemente otros factores neurotróficos liberados por células astrocitarias, participan de forma destacada en este proceso de transdiferenciación. Como consecuencia de estas apreciaciones, cuando se consideren protocolos de terapia celular con CM mesenquimales adultas, en lesiones del Sistema Nervioso, no parece necesario proceder a la diferenciación neuronal in vitro de estas CM, como un paso previo a su administración intralesional.

Referencias bibliográficas

1. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992; 255:1707-1710.
2. Johansson C, Momma S, Clark D, Risling M, Lendahl U, Frisen J. (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 1999; 96:25-34.
3. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, Digirolano C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats. Similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:3908-3913.
4. Sánchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper Dr, Sanberg PR. Adult

Zurita M., Aguayo C.,
Oya S., et al.

Implicación de factores neurotróficos en
la transdiferenciación neuronal de
células madre mesenquimales adultas

- bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol.* 2000; 164:247-256.
5. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate to neurons. *J Neurosci Res.* 2000; 61: 364-370.
 6. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after into neural mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:10711-10716.
 7. Lu P, Blesch, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: Differentiation, transdifferentiation, or artifact?. *J Neurosci Res.* 2004; 77: 174-191.
 8. Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: Disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res.* 2004; 77: 192-204.
 9. Zurita M, Vaquero J, Oya S, Miguel M. Schwann cells induce neuronal differentiation of bone marrow stromal cells. *NeuroReport* 2005; 16: 505-508.
 10. Zurita M, Vaquero J. Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cell transplantation. *NeuroReport* 2004; 15: 1105-1108.
 11. Brazelton TR, Rossi Fabio MV, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science.* 2000; 290: 1775-1779.
 12. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, Mckercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science.* 2000; 290: 1779-1782.
 13. Acheson A, Barker PA, Alderson RF, Miller FD, Murphy RA. Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF. *Neuron.* 1991; 2: 265-275.
 14. Weidner N, Blesch A, Grill RJ, Tuszynski MH. Nervegrowth factor-hypersecreting Schwann cells grafts augment and guide spinal cord axonal growth and remyelinate central nervous system axons in a phenotypically appropriate manner that correlates with expression of L1. *J Comp Neurol.* 1999; 413: 495-506.
 15. Yamamoto M, Sobue G, LI M, Arakawa Y, Mitsuma T, Kimata K. Nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and low-affinity nerve growth factor receptor (LNGFR) mRNA levels in cultured rat Schwann cells; differential time-and dose-dependent regulation by cAMP. *Neurosci Lett.* 1993; 152: 37-40.