

Obtención de tejido nervioso artificial a partir de células madre del tejido adiposo (ADSCs): nuevas esperanzas para el tratamiento de patologías traumáticas y degenerativas del Sistema Nervioso

Kevin Doello 1

1 Medical Oncology Service, Virgen de las Nieves Hospital, Granada, Spain

*Corresponding author: Kevin Doello, kdoello@correo.ugr.es

Introducción

Las patologías que afectan al sistema nervioso tanto central como periférico suponen un gran reto para la Biomedicina por carecer muchas de ellas hoy día de un tratamiento definitivo que lleve a la curación completa del paciente. Tal es el caso de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson o la Esclerosis Múltiple, y de fenómenos traumáticos tales como las lesiones medulares (shock medular) o la parálisis cerebral asociada a accidentes de diversa índole.

Hoy día, muchas de ellas se tratan de forma farmacológica con resultados infructuosos. Sin embargo, la aparición de la terapia celular y las células madre abren nuevas esperanzas de curación para muchas de estas enfermedades.

El artículo que nos ocupa versa sobre la utilización de células madre, concretamente células madre mesenquimatosas del tejido adiposo (ADSCs) en la obtención exitosa de tejido nervioso bioartificial en laboratorio con el fin de ser utilizado en la regeneración de regiones lesionadas a nivel cerebral o medular.

Células madre adultas

El término célula madre es un tanto equívoco dado que incluye a multitud de tipos celulares muy diferentes entre sí. Uno de esos tipos

celulares son las células madre embrionarias. Estas células son pluripotenciales, lo cual quiere decir que son capaces de dar tejidos de cualquiera de las tres hojas embrionarias humanas (endodermo, mesodermo, ectodermo). Sin embargo, a día de hoy no son utilizadas en terapia celular debido a su potencial oncogénico y a los problemas éticos ligados a su empleo. Por otro lado, recientemente han aparecido las conocidas como células madre pluripotenciales inducidas o iPS, creación de Yamanaka en el año 2006 y que consisten en la utilización de una célula epidérmica adulta que mediante la modificación de unos pocos genes se transforma en una célula madre pluripotencial. Pero tampoco son adecuadas en terapia celular ya que conservan metilados el resto de genes tal y como lo estaban en su estado adulto epidérmico. Ante estos dos primeramente prometedores pero realmente ineficaces tipos celulares se encuentran las células madre adultas o adult stem cells las cuales están dando excelentes resultados tanto en Ingeniería Tisular (construcción de tejido artificial en laboratorio) como en Medicina Regenerativa (reparación de órganos o tejidos dañados con células indiferenciadas o ligeramente diferenciadas). Este tipo de células, como su propio nombre indica, se encuentran en los tejidos de organismos adultos, como la

grasa o la pulpa dental, siendo responsables de la regeneración tisular en el individuo adulto. Son de carácter multipotencial (e incluso, unipotencial), lo cual quiere decir que originan tejidos solamente de la hoja embrionaria de la que proceden. Es decir, una célula madre estromal de la médula ósea sólo origina tejidos mesenquimatosos tales como tejido óseo, cartilaginoso o adiposo. Afortunadamente este inconveniente es solventado por el proceso de transdiferenciación que permite que se obtengan células de tejidos adultos de los distintos linajes u hojas embrionarias existentes.

Las células madre adultas conocidas hasta la fecha son: las células madre hematopoyéticas (HSCs), las células madre mesenquimatosas (MSCs), las células madre neurales (NSCs), las células madre endoteliales (EPCs), las células madre del limbo epitelial (LSCs), los pericitos y las células madre cancerosas (CSCs). Dentro de las células madre adultas encontramos muy diversos tipos. Concretamente en Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa se utilizan mucho las células madre adultas mesenquimatosas, llamadas así por originar tejidos derivados del mesénquima, tales como hueso, cartílago, grasa y tendones. Son las células madre de la gelatina de Wharton (HWJSCs) del cordón umbilical, las células madre de la pulpa del diente (DPSCs), las células madre estromales de la médula ósea (BMSSCs) y, por último, las células madre del tejido adiposo (ASCs) que son las que nos ocupan en el presente artículo [1]. Estos tipos celulares son los mejores en Terapia Celular tanto por su capacidad para ser diferenciados hacia estirpes tisulares muy diversas como por no presentar los inconvenientes de los otros dos tipos celulares descritos anteriormente. A continuación veremos cómo a partir de uno de estos tipos celulares, las células madre mesenquimatosas de la grasa, pueden obtenerse componentes celulares del sistema nervioso, y con ello tejido nervioso

artificial que puede ser utilizado para tratar multitud de enfermedades hasta la fecha incurables.

Pero antes analizaremos la incuestionable capacidad proliferativa, diferenciativa y terapéutica que hace de estas células una opción de futuro no sólo para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso sino de muy diversa índole.

Células madre del tejido adiposo

Como hemos definido anteriormente se trata de una población de células madre mesenquimatosas (MSCs) que se encuentran en el tejido adiposo adulto. Más concretamente alrededor de los capilares y vénulas del mismo, por lo que en muchos casos han sido confundidos con pericitos vasculares.

Presentan morfología fusiforme al microscopio óptico (Figura.1) y son positivas para el filamento intermedio vimentina, el cual es característico de poblaciones mesenquimatosas.

Pero, ¿qué características poseen que las hacen adecuadas para la obtención ya sea in vivo o in vitro de tejidos artificiales? Por un lado, su elevada capacidad tanto proliferativa como para resistir multitud de subcultivos en laboratorio. La primera cuestión queda confirmada con una capacidad que presentan estas células y no otras y es que son capaces de producir de forma autocrina FGF-2 (factor de crecimiento fibroblástico 2) el cual les autoinduce un crecimiento más rápido de lo habitual. Pero esto no sería importante si no fuesen células capaces de resistir un elevado número de subcultivos. Esto último se confirma gracias a que se ha detectado en ellas una elevada actividad de la enzima telomerasa como consecuencia de una sobreexpresión del dominio catalítico de la misma. Por tanto, ambos hechos nos ponen de manifiesto la gran capacidad de estas células tanto para crecer a gran velocidad en laboratorio como para resistir un elevado número de subcultivos [2].

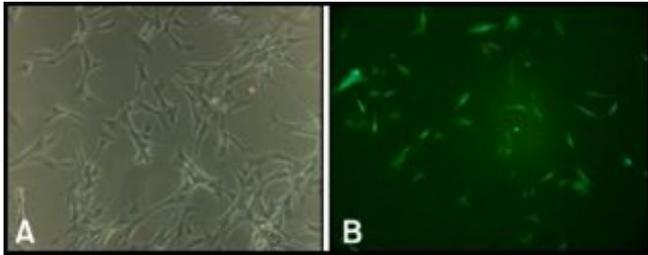


Figura 1. Células madre del tejido adiposo (ADSCs). Pueden verse dos imágenes, una para microscopia óptica (A) y otra para fluorescencia por GFP (Green Fluorescent Protein) (B). Tomado de Ryu HH et al. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury..

Sin embargo, lo que las convierte en un arma terapéutica de primera línea es su gran capacidad de diferenciación como células madre mesenquimatosas que son. De hecho, los estudios realizados confirman en todos los puntos estudiados la capacidad multipotencial de estas células y con ello sus enormes posibilidades de diferenciarse hacia estirpes celulares muy diversas ya sea a linaje mesenquimatoso o a otros por el proceso de transdiferenciación. Puede verse como cumplen los 5 requisitos necesarios para ser consideradas como MSCs [3]:

1. Se adhieren a los plásticos empleados en los recipientes de cultivo.
2. Sin necesidad de procesos de transdiferenciación, son capaces de originar tejido óseo, cartilaginoso y adiposo en laboratorio.
3. Son positivas para marcadores de superficie característicos de células madre mesenquimatosas: CD73, CD90, CD105
4. Son negativas para marcadores característicos de células de linaje hematopoyético: CD14, CD11b, CD31, CD34, CD45, CD79a, CD144 y factor de Von Willebrand.
5. En los análisis por microarrays podemos ver que en ellas se encuentran sobreexpresados genes que también lo están en otras células madre como son ECM 2, glypican-4, ID 1, NFIB, HOXA5 y HOXB6.

Con esto hemos podido ver que cumplen a la

perfección con los criterios de una MSCs, gozando de la gran capacidad de diferenciación de las mismas. Pero no solamente son tremendamente eficaces por su elevada capacidad de proliferación y diferenciación sino porque aparte de lo anterior son además muy adecuadas para su utilización terapéutica. Veamos el porqué [4].

- No presentan expresión para el MHC -II y más concretamente para la subunidad HLA – DR del mismo, por lo que no actuarían como células presentadoras de antígeno y no desencadenarían reacciones de rechazo agudo. Por otro lado, la expresión para el MHC– I es muy baja por lo que las reacciones de rechazo crónico serían casi inexistentes. En conclusión, todo tejido construido a partir de células madre derivadas del tejido adiposo no produciría rechazo alguno, independientemente del donante de las células.

- Como añadido al apartado anterior, cabe destacar que no sólo no producen rechazo sino que inducen inmunosupresión. Se trata de un tema aún en proceso de investigación.

- La obtención de las ASCs puede realizarse mediante la lipoaspiración de tejido adiposo de los pliegues corporales, por lo que su obtención es relativamente sencilla, además de poder ser realizada en un individuo adulto de cualquier edad.

- Por último, no sólo tienen una gran capacidad de diferenciación sino que secretan multitud de factores de crecimiento y diferenciación de forma paracrina como EGF, VEGF, FGF, KGF, PDGF, HGF, TGF – β , IGF, BDNF, G-CSF, GM-CSF, MCSF, IL-6, IL-1, IL-11, IL-12, LIF, TNF- α . Esto las convierte en pequeñas industrias de factores de crecimiento que implantadas sin más en tejidos dañados pueden inducir su reparación.

En definitiva, todas estas características anteriores son las que están permitiendo que estas células se estén comenzando a

utilizar recientemente no sólo para obtener tejidos artificiales en el laboratorio sino para tratar diversas patologías tales como la diabetes, el cáncer o, incluso, la disfunción eréctil.

Sin embargo, su empleo en el campo de la reparación del tejido nervioso está aún por explorar. A continuación analizaremos el elevado potencial de las ADSCs hacia diversos tejidos corporales para centrarnos posteriormente en la obtención de tejido nervioso artificial de diversas regiones ya sea *in vivo* o *in vitro* [4].

Diferenciación hacia diferentes linajes de las ASCs

Son muchos los tipos celulares que se pueden obtener a partir de las ASCs. Para ello es necesario que éstas células sean cultivadas en un medio con los factores de crecimiento o diferenciación adecuados (Figura 2).

Diferenciación de las ASCs hacia linaje nervioso

Como bien sabemos, dentro del linaje nervioso hay diferentes componentes. Uno de ellos son las neuronas. Sin embargo, también encontramos células de sostén nutricional y mecánico, y aislamiento eléctrico que son las células de la glía. Dentro de estas últimas destacamos los astrocitos (función nutricional), la oligodendroglía (aislamiento eléctrico, contribuyendo a formar

la vaina de mielina en el SNC) y las células de Schwann (también de aislamiento eléctrico, contribuyendo a la formación de la vaina de mielina en el SNP). Para obtener los tipos celulares anteriormente mencionados en laboratorio es necesario cultivar las ADSCs en diferentes medios. He aquí algunos de ellos [6].

Obtención de neuronas

- NGF (factor de crecimiento nervioso) + BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) + FBS (suero bovino fetal).

- BDNF + Ácido Retinoico + FBS

- Ácido Valproico + BHA

(Hidroxisisla Butilada) + Cloruro Potásico + Forscolina + Hidrocortisona

Obtención de glía (células de Schwann)

- FBS + N2 + Forscolina + Heregulina

β

Una vez que las células ADSCs han sido cultivadas en laboratorio el siguiente paso es determinar si las ADSCs se han diferenciado

hacia el linaje nervioso y concretamente hacia el tipo celular deseado. Para ello se analizan

diversos marcadores entre los que figuran:

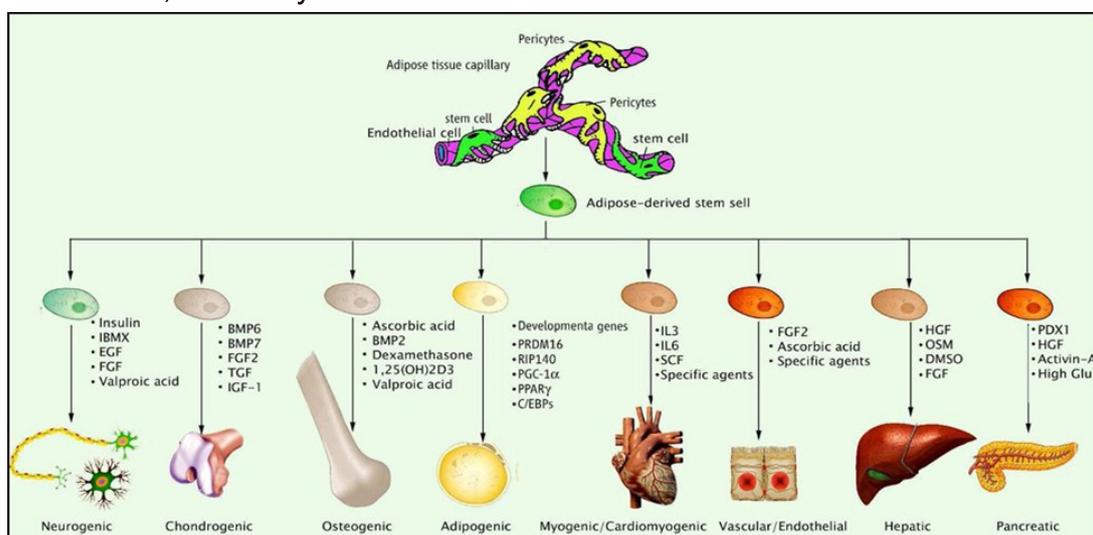


Figura 2. Posibilidades de diferenciación de las ADSCs y los medios de inducción necesarios en cada caso. Modificado de Lin G et al. Potential of Adipose-Derived Stem Cells for Treatment of Erectile Dysfunction.

- Tubulina beta 3: en todas las células nerviosas.
- GFAP (proteína glial fibroácida): en astrocitos y células de Schwann.
- Nestina: neuronas.
- Tiroso - hidroxilasa: neuronas productoras de dopamina.
- S100: ependimoma, astrocitoma, astrocitos y células de Schwann.
- CNPasas: oligodendrocitos y células de Schwann.

La comprobación de la presencia celular de estos elementos se suele realizar por inmunofluorescencia o inmunohistoquímica. A continuación expondré tres experimentos en los que se utilizan las ADSCs para tratar diversas regiones nerviosas y, por ello, diferentes posibles patologías de este sistema. En el primero, tejido neural artificial creado en laboratorio, en el segundo, la utilización de las ADSCs en la recuperación de lesiones de la médula espinal (mediante la obtención glial y neural) y el tercero el empleo de éstas en la estimulación de la reparación de daños a nivel de nervios periféricos.

Obtención de tejido neural artificial en laboratorio.

Según Nieto-Aguilar et al. [7] se obtuvieron neuronas artificiales en cultivo mediante la transdiferenciación de células madre del tejido graso (ADSCs). Las células madre del tejido adiposo fueron obtenidas como consecuencia de procesos quirúrgicos de Cirugía Plástica. El tejido fue posteriormente sumergido en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) junto con antimicóticos y antibióticos. Tras ello, el tejido fue lavado con PBS y se aislaron las ADSCs gracias al empleo de colagenasa tipo I. Las ADSCs fueron cultivadas en un medio con DMEM, suero bovino fetal (FBS) junto con antibióticos y antimicóticos. Se obtuvo así el cultivo primario de ADSCs. Sin embargo, ahora hay que cultivarlas en medio neurogénico para lograr la obtención de neuronas a partir de las ADSCs. En la

presente investigación se hará de dos formas: en cultivos en 2D, es decir, sobre superficies planas de cultivo celular a las cuales las células se encuentran adheridas; y en cultivos 3D, los cuales consisten en andamios fibrilares entre cuyos huecos crecen las células y se diferencian. Concretamente los que van a ser empleados aquí son de fibrina-agarosa. Por tanto, se pretende ver no sólo si se logra una adecuada diferenciación hacia el linaje neural sino también si ésta es mejor con el sistema de crecimiento 2D o 3D. Para llevar la inducción hacia la estirpe neural se utilizó un medio basal (DMEM + FBS) suplementado con 20nM de Ácido Valproico, 1 mM de Hidroxinisol Butilada (BHA), 50 mM de Cloruro Potásico, 10nM de Forscolina, 1 nM de Hidrocortisona y 5 mg/mL de ITS. Los cultivos fueron analizados a las 24 horas, 10 días y 20 días desde el comienzo del experimento empleando para ello tinción por Hematoxilina – Eosina (H&E), inmunofluorescencia para nestina y análisis de expresión génica por microarrays. El procesamiento de las muestras fue diferente en cada caso. En el caso de los cultivos en 2D las células fueron pasadas a chambers, mientras que las cultivadas en el constructo de fibrina-agarosa en 3D tuvieron que ser procesadas en parafina y cortadas mediante el microtomo de rotación. Los resultados tanto para la tinción de hematoxilina-eosina como para la inmunofluorescencia de nestina fueron concluyentes ya que ponen de manifiesto que a medida que pasa el tiempo se observa no sólo un número mayor de células sino que para el caso de la H&E puede verse que esas células presentan un axon y dendritas primitivas. En el caso de la inmunofluorescencia para nestina (filamento intermedio característico de las neuronas) se observa que con el paso de los días el número de células positivas para nestina aumenta considerablemente así como la cantidad de esta proteína en el interior celular.

En el análisis de expresión génica por microarrays podemos ver que las nuevas células expresan más los genes característicos de las neuronas que las células madre multipotenciales de la grasa de las que proceden. Cabe destacar a los genes NCAM 2, NEFM, NEUROG 3, NGF, NGFRAP1; SLC32A1, SLC6A13y SLC6A8. Todo esto nos lleva a concluir que se ha logrado la obtención exitosa de neuronas en laboratorio a partir de células madre mesenquimatosas de la grasa. Cabe puntualizar que no se trata de neuronas totalmente formadas y que sólo cuando son implantadas en el organismo adulto se diferencian completamente.

Regeneración de daños en la médula espinal

Si en las investigaciones anteriores se describía cómo obtener neuronas in vitro, en éstas veremos como las ADSCs directamente aplicadas sobre una lesión medular son capaces de transformarse en células nerviosas de diverso tipo tanto neuronas como astrocitos y oligodendroglía. En este experimento [8] se emplearon perros a los cuales se lesionó la médula espinal. Tras ello, y una vez se hubo comprobado que la lesión había tenido el efecto deseado, a un grupo se les transplantó ADSCs marcadas con GFP (proteína verde fluorescente) en el lugar de la lesión. A otro grupo se les trató con PBS (grupo vehículo) y a otro no se le sometió a ningún tratamiento (grupo control). A las nueve semanas se analizó la médula espinal de estos perros mediante tinción de H&E, Klüver-Barrera y diversas inmunofluorescencias.

Los resultados fueron concluyentes sólo en el grupo tratado con las ADSCs ya que se observó que en la zona de la lesión había aparecido una zona de gran densidad celular que no se correspondía con ADSCs sino con neuronas, astrocitos y oligodendroglía que habían surgido a partir de las ADSCs, repoblando la zona dañada (Figura 3). Asimismo, el área de mielinización era mayor que en el grupo control y el grupo vehículo.

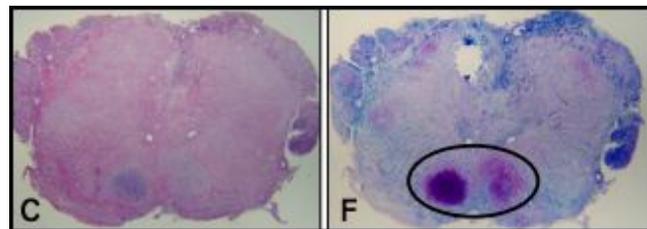


Figura 3. Tinción de H&E (C) y de Klüver-Barrera (F) en las que se muestra una gran proliferación celular en el área de la lesión donde fueron implantadas las ADSCs. Tomado de Ryu HH et al. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury.

Por tanto, a la luz de estos resultados, las células madre del tejido adiposo (ADSCs) son unas excelentes candidatas para tratar lesiones a nivel de la médula espinal.

Reparación de nervios periféricos

Estas investigaciones demuestran que las ADSCs no sólo sirven para tratar lesiones a nivel del Sistema Nervioso Central, ya sea a nivel encefálico o medular, sino que también contribuyen a la regeneración de los nervios periféricos.

En este experimento [9] se utilizaron ratones macho a los cuales se seccionó el nervio peroneo común. Tras ello se dividieron en varios grupos de tratamiento: uno control al que se suministró solamente el andamiaje en el cual se introducirían las células en el lugar de la lesión (matrigel); otro grupo al que se suministró matrigel con vitamina B12; y finalmente un tercer grupo al que se suministró matrigel con ADSCs. Dentro de este último existían varios subgrupos según las ADSCs hubieran sido cultivadas previamente en laboratorio en un medio neurogénico o no. Al cabo de 10 días se sometió la región que había sido lesionada y tratada con matrigel a un estudio por inmunofluorescencia y a un estudio genético por microarrays. Primeramente se observó que la reparación nerviosa fue mucho mayor en el caso del matrigel que contenía ADSCs con respecto a los otros dos grupos, lo cual podía verse en los resultados obtenidos por

inmunofluorescencia que pusieron de manifiesto crecimiento axonal (Figura 8). Esto se debió a que las ADSCs produjeron BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), el cual es un potente estimulante del crecimiento axónico. En el caso de las ADSCs que habían sido previamente inducidas en un medio neurogénico, la producción de BDNF era mucho mayor, así como el crecimiento axonal y, con ello, la regeneración nerviosa. Por tanto, hemos podido ver que no sólo las ADSCs son adecuadas para la regeneración encefálica o medular sino que aceleran con creces los procesos naturales de regeneración nerviosa periférica gracias a la producción de BDNF, que estimula el crecimiento axónico.

Expectativas de futuro.

Estos elementos del tejido nervioso ya sean neuronas o células de la glía, obtenidos artificialmente a partir de ADSCs podrían ser utilizados para tratar patologías del Sistema Nervioso ya sean traumáticas o autoinmunes. Veamos algunos ejemplos.

Parkinson y Alzheimer

La enfermedad de Parkinson es debida a la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de Sommering. La diferenciación de ADSCs hacia neurona dopaminérgica de la sustancia negra de Sommering y su posterior implantación en la región mesencefálica correspondiente podría ser un tratamiento efectivo para la enfermedad de Parkinson. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, la implantación cortical de neuronas diferenciadas a partir de ADSCs podría ser un buen método para frenar la pérdida de neuronas asociada a esta enfermedad.

Esclerosis múltiple

El empleo de oligodendrocitos artificiales obtenidos a partir de ADSCs podría ser una importante terapia para el tratamiento de esta enfermedad que se caracteriza por ser un progresivo proceso de desmielinización

central ocasionado por un fenómeno de autoinmunidad. Los oligodendrocitos regenerarían la vaina de mielina deteriorada o perdida. Estos a su vez, podrían estar complementados con ADSCs inmaduras, las cuales como bien se saben son inmunosupresoras, lo que ayudaría a disminuir la respuesta autoinmunitaria.

Lesiones de la médula espinal (paraplejía, tetraplejía) y a nivel encefálico (parálisis cerebral, hemiplejía)

Este tipo de lesiones también podrían ser tratadas con células gliales o neuronas obtenidas a partir de ADSCs en laboratorio. El incorporar oligodendrocitos artificiales en médulas espinales dañadas podría mejorar o incluso recuperar a los pacientes aquejados de lesiones medulares. En el caso de lesiones encefálicas, ya sean de causa traumática, isquémica o hipóxica, neuronas artificiales podrían regenerar zonas lesionadas contribuyendo a que el paciente vuelva a recuperar la funcionalidad sensitiva y/o motriz perdida.

Estas reflexiones realizadas a la luz de los prometedores resultados obtenidos no son más que el punto de partida de futuras investigaciones de laboratorio y clínicas que posiblemente nos lleven en un futuro a poder tratar de forma más eficaz o incluso a acabar con estas enfermedades a día de hoy incurables.

Conclusión

Las células madre mesenquimatosas del tejido adiposo (ADSCs) han demostrado en los experimentos expuestos ser adecuadas para la obtención de tejido nervioso artificial que podría ser usado con diversos fines terapéuticos tanto en enfermedades a nivel encefálico como medular, así como para acelerar la regeneración nerviosa periférica.

No obstante son resultados in vitro muy preliminares que requieren aún gran rodaje clínico hasta saber cuál puede ser su

Stambolsky D, Rubina K, Revischin A et al. Adipose-Derived Stem Cells Stimulate Regeneration of Peripheral Nerves: BDNF Secreted by These Cells Promotes Nerve Healing and Axon Growth De Novo. PloS ONE 2011; 6(3).

Referencias

1. Tárnok A, Ulrich H, Bocsi J. Phenotypes of Stem Cells from Diverse Origin. *Cytometry* 2010; 77(A):6-10.

2. Schäffler A, Büchler C. Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells—Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *Stem Cells* 2007; 25:818-27.

3. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol L* 2003; 89: 267-70.

4. Lin G, Banie L, Ning H, Bella AJ, Lin CS, Lue TF. Potential of Adipose-Derived Stem Cells for Treatment of Erectile Dysfunction. *J Sex Med* 2009; 6(3):320-7.

5. Tobita M, Orbay H, Mizuno H. Adipose-derived Stem Cells: Current Findings and Future Perspective. *Discov Med* 2011; 11(57): 160-70.

6. Zavan B, Vindigni V, Gardin C, D'Avella D, Della Puppa A, Abatangelo G et al. Neural Potential of Adipose Stem Cells. *Discov Med* 2010; 10(59):37-43.

7. Nieto – Aguilar R, Serrato D, Garzón I, Campos A, Alaminos M. Pluripotential Differentiation Capability of Human Adipose-derived Stem Cells in a Novel Fibrin-agarose Scaffold. *J Biomat Appl* 2011; 25:743-68.

8. Ryu HH, Lim JH, Byeon YE, Park JR, Seo MS, Lee YW et al. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *J Vet Sci* 2009; 10(4): 273-84.

9. Lopatina T, Kalinina N, Karagyaur M,