

CÉLULAS MADRE Y ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS

Dra. Vanesa Heyd

LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO CELULAR
FLENI



DIRECCIÓN DE CONTACTO: FLENI, MONTAÑESES 2325, C1428AQQ, BUENOS AIRES // vheyd@fleni.org.ar

INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha observado una nueva área de interés cuyo foco se centra en torno a las células madre y el sistema nervioso en términos de su potencial, tanto para descifrar puntos relacionados con el desarrollo como su potencial terapéutico. A continuación se desarrollarán aspectos claves para el entendimiento de esta nueva área como son los distintos tipos de células madre, implicaciones terapéuticas y aplicaciones clínicas.

DEFINICIÓN

Las células madre fueron originariamente descritas en el sistema hematológico, pero actualmente se las han encontrado en muchos otros

sitios, incluido el cerebro. Todas estas células comparten las mismas propiedades de autorenovación y multipotencialidad.²

Cada una de estas células individuales en el desarrollo temprano no está especializada (sin diferenciar), es decir, no posee aún una función específica en el cuerpo, aunque tiene la capacidad de contribuir a todos los órganos de un individuo, es decir, se conoce como *totipotente*.

Estas células se llaman células madre embrionícas (ES en sus siglas en inglés) y tienen tanto la capacidad de autorenovarse, manteniendo así un suministro continuo de células madre, como también la habilidad de dar origen a células especializadas (diferenciadas), tales como células del hígado¹², de la sangre⁴, cardiomiocitos⁸ o del cerebro^{7,14}. Figura 1.

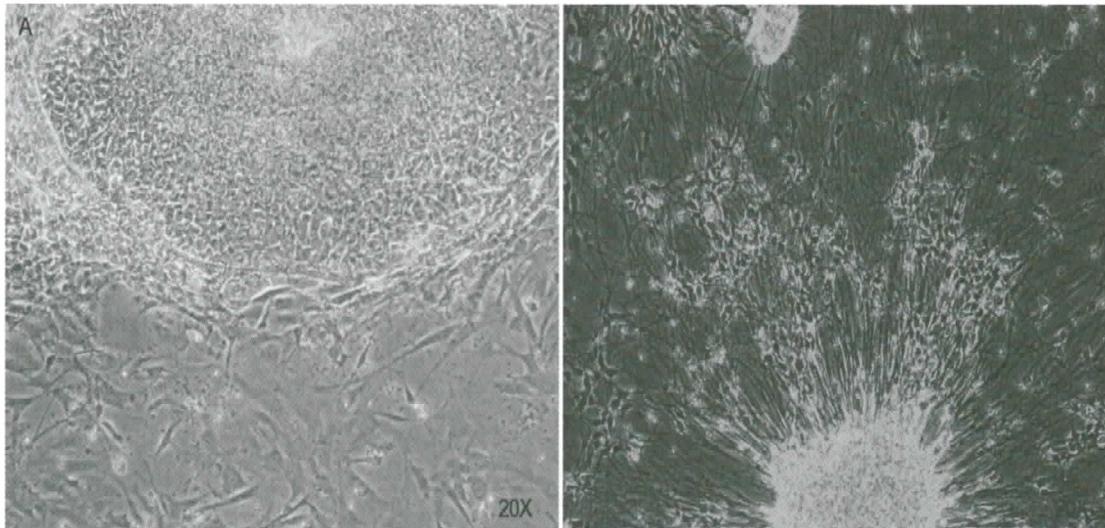


Figura 1: A. células madre embrionarias en estadio indiferenciado co-cultivadas sobre fibroblastos fetales de ratón. Magnificación 20X. Figura 1: B. Neuronas obtenidas a partir de células madre embrionarias en cultivo. Magnificación 20X

Las células madre también existen en los adultos y permiten que ciertos tejidos se regeneren durante la vida. Ellas también tienen la habilidad de autorenovarse y de poder diferenciarse en múltiples linajes. De hecho, la lista que identifica las células madre en adultos y las líneas específicas de células progenitoras (con habilidades limitadas de autorenovación) está creciendo³.

FUENTES DE OBTENCIÓN

Las células pueden ser obtenidas de varias fuentes, entre ellas los embriones extras que han sido almacenados en clínicas de fertilidad y que no fueron utilizados por las parejas donantes para la concepción de niños, embriones creados por medio de fertilización *in vitro* (artificialmente en el laboratorio) para el propósito específico de obtener células madre y embriones clonados en laboratorios por medio del método de transferencia somática nuclear, con el fin de aislar sus células madre. También podemos aislarlas de los fetos de desarrollo temprano que han sido abortados, cordones umbilicales, de tejidos u órganos adultos y por último, el aislamiento y supervivencia de células progenitoras neurales de tejidos post-mortem (hasta 20 horas después de la muerte) ha sido reportado y provee una fuente adicional de células madre humanas⁹.

La razón por la que estas células reciben tanta atención como posibles fuente de tratamiento está relacionada con los siguientes hechos, su gran capacidad para proliferar en cultivos partiendo de una fuente limitada de células, su potencial para ser trasplantadas en los propios pacientes, la habilidad para migrar y diseminarse posterior al trasplante y la fácil manipulación utilizando metodología específica.

TERAPIA CON CÉLULAS MADRE PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS

La principal esperanza terapéutica en las células madre es que se puedan emplear para terapias celulares y trasplantes de tejidos, sin los problemas actuales ligados a los aloinjertos, escasez de donantes histocompatibles, necesidad de administrar drogas inmunosupresoras (ciclosporina, corticoides) con sus efectos secundarios (riesgo de

infecciones, de cáncer, nefropatías, etc). Lo ideal sería derivar tejido con la identidad histológica del propio paciente para hacer autotransplantes¹⁰. Debido a las limitaciones que posee el tejido nervioso para regenerarse o reparar daños, es necesario desarrollar nuevos acercamientos terapéuticos para abordar dichos trastornos. No existen tratamientos regenerativos eficaces o que detengan la muerte celular en estas patologías. Las células madre se visualizan como una alternativa terapéutica para estas enfermedades donde la regeneración es vital para lograr un efecto terapéutico mayor a los pocos e ineficientes tratamientos sintomáticos que hoy existen¹. Las células madre ofrecen la oportunidad de transplantar una fuente viva para la autoregeneración. El aislamiento de células madre y células progenitoras adicionales se está desarrollando ahora para apoyar a muchas otras aplicaciones clínicas.

ENFERMEDAD DE PARKINSON (EP)

La EP es un desorden neurodegenerativo caracterizado por pérdida de las neuronas dopaminérgicas de una región del mesencéfalo denominada sustancia nigra, con la subsecuente reducción de los niveles de dopamina¹⁶, con una incidencia del 1,4% en la población mayor a 55 años. Los tratamientos actuales farmacológicos o quirúrgicos son solo sintomáticos. Estudios realizados en modelos animales e investigaciones clínicas en humanos han demostrado que el trasplante con neuronas dopaminérgicas fetales pueden producir un alivio de la sintomatología de carácter temporario⁶. Las dificultades éticas y técnicas para la obtención apropiada de estas células fetales limita la aplicación de esta terapia. Por otro lado la implantación de precursores neuronales obtenidos a través de cultivo de células madre embrionarias y su posterior diferenciación parecería un acercamiento más apropiado en el momento de abordar una terapia para esta enfermedad¹⁵. Figura 2.

ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES

Los precursores neuronales obtenidos de cultivo de células madre son también considerados para reemplazar a las células de la glía que se han perdido en las enfermedades desmielinizantes. Modelos animales de desmielinización total han sido utilizados para examinar y evaluar la capaci-

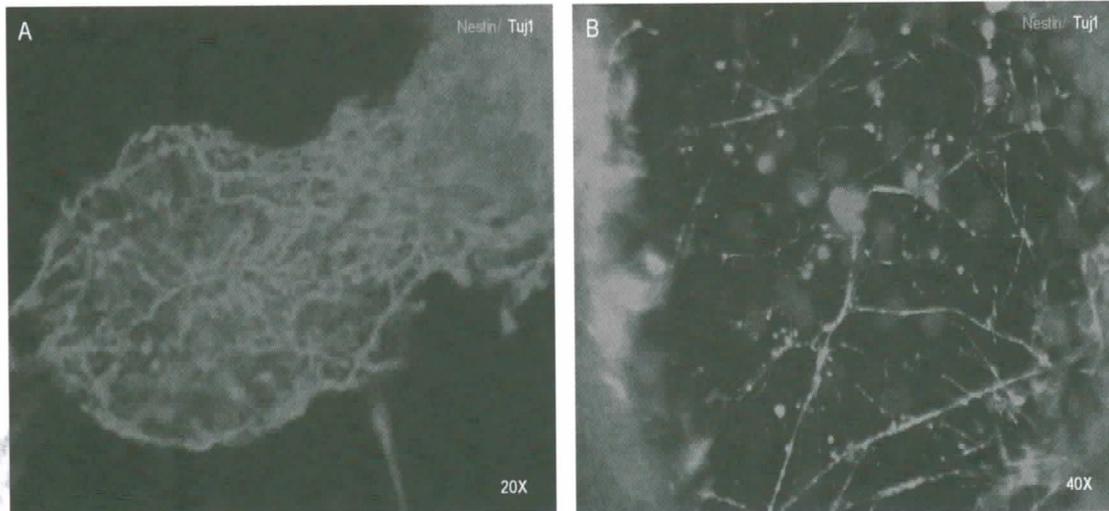


Figura 2: A y B. Inmunomarcación positiva para Nestin y Tuj1 (precursores neuronales) en células diferenciadas partir de células madre embrionicas. Magnificación 20X y 40 X respectivamente.

dad de que poseen estas células para remielinizar los segmentos afectados. Los oligodendrocitos constituyen un pequeño porcentaje de células diferenciadas que surgen espontáneamente de la diferenciación de precursores neuronales a los cuales se les adicionan factores de crecimiento como EGF o FGF₂ bajo condiciones de cultivo, es decir *in vitro*. Sin embargo, cuando estas células son transplantadas en un ambiente de deficiencia de mielina, se ha observado un incremento de la diferenciación hacia oligodendrocitos, la cual está asociada con alguna recuperación de la mielina y en algún grado, recuperación funcional¹⁷.

modelos animales con lesión medular, incluyendo el trasplante de células envoltoras olfatorias (tipo especializado de células de la glia). Las células envoltoras olfatorias pueden ser obtenidas *in vitro* de muestras extraídas del tracto olfatorio del adulto y poseen la propiedad de promover el crecimiento de los axones y actúan como soporte de la remielinización cuando son implantadas en sitios con lesiones corticoespinales¹¹. La capacidad de promoción y regeneración axonal de estas células fue descrito por primera vez en 1994 en ratas adultas con sección completa de la médula espinal¹³. Figura 3

LESIONES MEDULARES

Las lesiones de la médula espinal son una afección prevalente que producen consecuencias funcionales devastadoras en los pacientes. Lesiones de la médula espinal (traumáticas, isquémicas o compresivas) interrumpen los tractos axonales en el sitio de la lesión y por ende la información que llevan las fibras sensitivas (ascendentes) y motoras (descendentes). Las consecuencias funcionales de esta desconexión entre el cerebro y la médula espinal depende de la gravedad de la lesión y de la cantidad de fibras dañadas. A lo largo de los años se han desarrollados múltiples estrategias con la finalidad de reparar los daños provocados por la lesión⁵, sin embargo no hay tratamientos efectivos o aceptados que puedan reparar los daños neurológicos. Lo que sí hay son numerosos registros que demuestran acercamientos muy exitosos en

PERSPECTIVAS

En la primera década de investigación en el área de células madre se han cumplido importantes objetivos, sin embargo, aún quedan muchas preguntas por responder y los retos son múltiples, por ejemplo; las células madre embrionicas de ratón y las humanas tienen potencial tumorigénico, ya que son células completamente indiferenciadas y con capacidad de diferenciarse hacia cualquier subtipo celular, por ello, si se inyectan a un animal adulto pueden originar teratomas y teratocarcinomas. Por lo tanto, un tema de seguridad será cerciorarse de que en un cultivo diferenciado a partir de ES no quedan estas células troncales indiferenciadas, o bien disponer de métodos fiables de separación y purificación de las células diferenciadas de interés respecto de las ES. Para ello habrá que avanzar en estudios de marcadores (al estilo de los CD de las

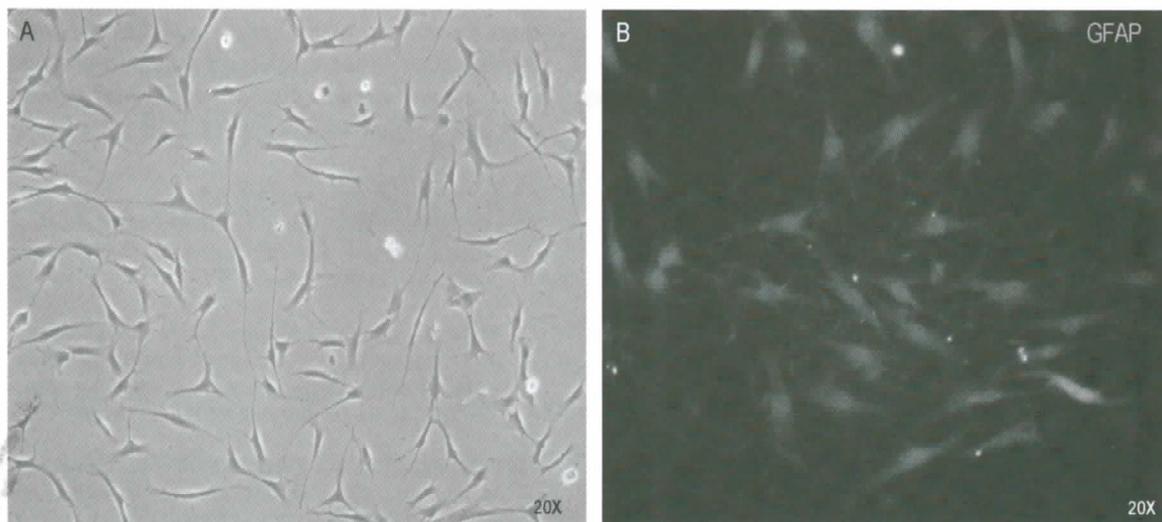


Figura 3: A. Células envoltantes olfatorias obtenidas de mucosa del tracto olfatorio. Magnificación 20X. B. Inmunomarcación positiva para GFAP (marcador de células de la glia) en células envoltantes olfatorias. Magnificación 20X.

células inmunes) para caracterizar todas las fases intermedias de cada ruta de diferenciación. En general, la obtención de poblaciones celulares puras exige el empleo de técnicas eficaces de selección clonal, por ejemplo, el uso del FACS (citómetro de flujo activado por fluorescencia, que discrimina poblaciones en función de marcadores de superficie). Alternativamente, se puede introducir por ingeniería genética en el genoma donante un bloque de genes que permita de manera simultánea la selección de las células diferenciadas y un sistema suicida que garantice la autodestrucción de las células que no se hayan diferenciado.

¿Podremos forzar a las células madre embrionarias a diferenciarse en líneas celulares concretas? Aún tenemos una idea muy pobre de la biología básica de las señales y factores implicados en el desarrollo y diferenciación del embrión humano, pero se espera que este campo avance con rapidez. Hay que asegurar la no introducción de mutaciones, que se pueden haber acumulado en el núcleo somático donante durante la vida del individuo. Será esencial garantizar que tales mutaciones no aumentan el potencial cancerígeno. Igualmente está la muy debatida cuestión de la "edad biológica" de las células. Mientras algunos informes hablan de mayoría de edad, otros dicen que el propio proceso de transferencia de núcleo somático "rejuvenece" las células y estimula a la telomerasa. Habrá que aclarar la eventual implicación de las alteraciones de la impronta genética (*imprinting*) sobre las células ES y sus derivadas, logradas tras transferencia nuclear.

¿Reprogramación directa de células somáticas? Una de las grandes aspiraciones de los estudios sobre el desarrollo embrionario y las células madre es la de desprogramar y reprogramar a placer células somáticas, sin necesidad de acudir a la transferencia de núcleos a ovocitos (con la consiguiente destrucción de embriones). Quizá una vez que conozcamos en detalle lo que ocurre *in vivo*, seamos capaces de convencer a ciertas células somáticas de comportarse como células pluripotentes y después encarrillarlas hacia los tipos celulares deseados.

Perspectivas con células madre de adultos.

Se han registrado algunos casos recientes que demuestran la flexibilidad inesperada de células madre de adultos para diferenciarse incluso en líneas que no son las suyas originales. Obviamente, si se confirman estos datos, y se avanza en esta línea, tendríamos una nueva posibilidad de terapias celulares y autotrasplantes, sin el problema ético de manipular y destruir embriones humanos, aunque sean "artificiales" (por transferencia de núcleo somático a ovocitos).

CONCLUSIÓN

La terapia con células madre está emergiendo como una de las áreas más excitantes de la neurociencia no sólo por los nuevos e importantes datos sobre el normal desarrollo que aportan, sino como agentes terapéuticos en un gran número de enfermedades neurológicas. Sin embargo el desarrollo

de estos acercamientos requieren paciencia y en alguna medida, la traslación del laboratorio a la clínica debe ser tomada lentamente y basada en los datos experimentales. Una falla en alguna de

estas áreas no solo afectaría a aquellas personas involucradas en las investigaciones sino también en las esperanzas depositadas por los pacientes en esta nueva terapéutica ●

REFERENCIAS

- 1 Barker RA, Jain M, Armstrong RJE, et al. Stem cells and neurological disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 553-557.
- 2 Cage FH, Ray J, Fisher JJ. Isolation, characterization and use of stem cells from the CNS. *Ann Rev Neurosci* 1995; 18: 159-92.
- 3 Czyz J, Wiese C, Rolletschek A, et al. Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. *Biological Chemistry* 2003; 384: 1391-409.
- 4 Chadwick K, Wang L, Li L, et al. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* 2003; 102: 906-915.
- 5 Fawcett JW. Spinal cord repair: from experimental models to human application. *Spinal Cord* 1998; 36: 811-817.
- 6 Freed CR et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons from severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001; 344: 710-719.
- 7 Lee SH, Lumelsky N, Studer L, et al. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 675-9.
- 8 Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 2003; 107: 2733-2740.
- 9 Palmer T, Schwartz PH, Taupin P, et al. Progenitor cells from human brain after death. *Nature* 2001; 411: 42-43.
- 10 Pera MF and Trounson AO. Human embryonic stem cells: prospects for development. *Development* 2004; 131: 5515-5525.
- 11 Radtke C, Akiyama Y, Brokaw J, et al. Remyelination of the nonhuman primate spinal cord by transplantation of H-transferase transgenic adult pig olfactory ensheathing cells. *Faseb J* 2004; 18: 355-7.
- 12 Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, et al. Generation of hepatocyte-like from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* 2003; 12: 1-11.
- 13 Ramon-Cueto A and Nieto-Sampedro M. Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplant. *Exp Neurol* 1994; 127: 232-244.
- 14 Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, et al. Neural progenitor from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 1134-1140.
- 15 Sveldensen CN, Caldwell MA. Neural stem cells in the developing central nervous system: implication for cell therapy through transplantation. *Prog Brain Res* 2000; 127: 13-34.
- 16 Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, et al. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *Journal of Clinical Investigation* 2005; 115: 102-109.
- 17 Yandava BD, Billingham LL, Snyder EY. Global cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: evidence from the dysmyelinated shiverer mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7029-34.