

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN ATAXIA DE FRIEDREICH

Grupo de Investigación: Embriología experimental. Instituto de Neurociencias UMH-CSIC San Juan de Alicante

INTRODUCCIÓN Y ESTADO DEL TEMA

Entre las enfermedades neurológicas más comunes que producen discapacidad están las enfermedades neurodegenerativas, y de entre ellas, la ataxia es un trastorno motor frecuente. La Ataxia de Friedreich (AF) es una enfermedad hereditaria que causa daño progresivo al sistema nervioso dando como resultado síntomas que varían desde perturbaciones de la marcha y problemas del lenguaje a la enfermedad cardíaca. La

Ataxia de Friedreich, es la ataxia hereditaria más prevalente, que afecta a alrededor de 1 de cada 50,000 personas. Ambos sexos se afectan por igual.

Como con muchas enfermedades degenerativas del sistema nervioso, actualmente no existe cura o tratamiento eficaz para la Ataxia de Friedreich. Sin embargo, muchos de los síntomas y complicaciones acompañantes pueden tratarse para ayudar a los pacientes a mantener un funcionamiento óptimo por el mayor tiempo posible. La fisioterapia puede prolongar el uso de los brazos y piernas. Los científicos esperan que

los avances recientes en la comprensión de la genética de la Ataxia de Friedreich lleven a descubrimientos en el tratamiento. Así la terapia celular ha sido propuesta como una vía para intentar evitar la muerte de las células neurales, evitando o frenando la progresión de la enfermedad. Múltiples tipos celulares se han propuesto para intentar regenerar neuronas perdidas en este tipo de enfermedades, incluso se ha explorado el uso de células embrionarias progenitoras neurales humanas que presentan importantes problemas clínicos (desarrollo de tumores embrionarios) y éticos.

Las células madre de médula ósea (CMO) es una población de células que ha demostrado ser efectiva en desordenes degenerativos de varios tipos. Gracias a su plasticidad fenotípica normal, además de generar las células madre sanguíneas, pueden diferenciarse como células productoras de hueso (osteoblastos), células cartilaginosa (condrocitos), células grasas (adipositos) (Prockop y col. 1997; Pittenger y col. 1999). Otros estudios han demostrado la producción de células de tipo neural a partir de CMO (Sanchez-Ramos y col. 2000; Woodbury et al. 2000; Bosolasco y col 2007), así como su potencialidad neurodegenerativa (Mahmood y col. 2002; Akiyama y col. 2002; Dezawa y col. 2002; Uccelli y Mancardi, 2010).

Nuestro laboratorio ha sido capaz de producir oligodendrocitos remielinizantes y neuronas a partir de CMO en modelos animales de desmielinización (Bonilla y col. 2002, 2005). Más recientemente hemos obtenido resultados que demuestran que en modelos crónicos de desmielinización (donde no se observan progenitores de células mielinizantes) las CMO trasplantadas pueden activar la regeneración de los progenitores oligodendrogiales del huésped, mediante un mecanismo mediado por señales neurotróficas (Jaramillo y col, en preparación). De manera más interesante hemos demostrado que las CMO implantadas en la médula espinal de un ratón modelo de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) ha mantenido un mayor número de neuronas motoras funcionales, evitando que se mueran (Cabanés et al., 2007). Lo que es más relevante para las ataxias, hemos mantenido mayor tiempo la super

vivencia de células del cerebelo y la función motora en un modelo animal de Ataxia Cerebelo-espinal (Jones et la., 2010).

Hemos visto pues que la actividad neurotrópica de las CMO en modelos de neurodegeneración están mediados la secreción de factores neurotróficos (GDNF, BDNF, Fgf), pero los procesos moleculares y celulares que subyacen a este efecto no son conocidos.

Las células que primariamente están afectadas en la AF son las neuronas de los ganglios raquídeos. Nuestra hipótesis experimental va encaminada al uso de terapia celular para mantener la supervivencia de estas células. Proponemos la terapia celular con CMO para esta enfermedad ya que experimentos preliminares han demostrado que las CMO inyectadas en el liquido cefaloraquídeo invaden y pueblan los ganglios dorsales de la médula, donde podrían ejercer su acción neurotrópica. La inyección intratecal de células es un procedimiento posible y poco peligroso en humanos, por lo que el desarrollo de un ensayo clínico posterior a resultados positivos experimentales puede ser una terapia viable en AF.

PROYECTO PROPUESTO

El proyecto se encuadra dentro de un programa de trabajo encaminado a demostrar la capacidad neuroprotectora (neurotrópica) de las células madre de médula ósea en enfermedades neurodegenerativas. Este programa está parcialmente financiado por el Instituto de Salus Carlos III a través de la Red Española de Terapia Celular.

OBJETIVOS

Vamos a estudiar los mecanismos moleculares y celulares que subyacen al efecto neurotrópico de las CMO sobre cultivos celulares de Ataxia de Friedreich (AF), como modelo de enfermedad. También, nos proponemos estudios in vivo en un modelo de ratón de AF, mediante le trasplante intratecal de CMO. El objetivo último es sentar las bases experimentales para el desarrollo de nuevas terapias y ensayos clínicos en AF.

METODOLOGÍA

Cultivos de líneas celulares:

1. Se han establecido cultivos de células mesenquimales, extraídas del ligamento periodontal y la pulpa dental de dientes de leche de dos enfermos con AF. Con ello se van a estudiar la genética de las células y su capacidad de supervivencia en el tiempo; así como su potencialidad neural. Todo ello comparadas con cultivos controles ya establecidos.
2. Se determinará si el co-cultivo de CMO (transfectadas con GFP) incrementa la supervivencia y la eficacia de diferenciación de las células con AF en los cultivos.
3. Determinar si existen factores secretables para este efecto. Cultivos de células AF con sobrenadante de cultivos de CMO.
4. Estudiar los procesos moleculares que se producen en las CMO para activar los mecanismos neurotróficos. Análisis transcritoómico y proteómico.

Estudios in vivo:

Los ratones modelo de AF (Fxn-tm1MKn) serán inyectados intratecalmente (mediante punción lumbar) con 300.000 CMO (ratón GFP-beta-actina) en 5 microlitros de solución de cultivo.

Analizaremos inyecciones control paralelas de cultivo celular solo (5 microlitros).

Se estudiará las funciones motoras antes (2 semanas) y después (2, 4, 6 y 8 semanas) del trasplante. Análisis histológico (2, 4 y 8 semanas): estudio estructural e inmunohistoquímico con marcadores de tipología celular y moléculas neurotróficas.

Estos estudios se realizarán durante 1 año.

BIBLIOGRAFÍA

- Aharonowiz M, Einstein O, Fainstein N et al. Neuroprotective effect of transplanted human embryonic stem cell-derived neural precursors in an animal model of multiple sclerosis. PLoS ONE 2008;3:e3145.
- Akiyama Y, Radtke C, Kocsis JD. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. J Neurosci 2002;22:6623–6630.
- Bonilla, S.; Alarcón, P.; Villaverde, R.; Aparicio, P.; Silva, A. and Martínez, S. "Hematopoietic progenitor cells from adult bone marrow differentiate into oligodendrocyte progenitors in the neonatal mouse". Eur. J. Neurosci. 15: 575-582 (2002)
- Bonilla S, Augusto Silva, Lourdes Valdés, Emilio Geijo, José Manuel García-Verdugo and Salvador Martínez. "Functional neural stem cells are derived from adult bone marrow". Neuroscience. 2005;133(1):85-95
- Bossolasco P, Cova L, Calzarossa C et al. Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. Exp Neurol 2005;193:312–325.
- Cabanes C, Bonilla S, Tabares L and Martinez S. "Neuroprotective effect of Adult bone marrow stem cells in a mouse model of motoneuron degeneration". Neurobiology of Disease, 26(2):408-418 (2007)
- Dezawa M, Kanno H, Hocino M et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. J Clin Invest 2004;113:1701–1710.
- Jones J, Jaramillo---Merchán J, Bueno C, Pastor D, Viso---León M, Martínez S. "Mesenchymal stem cells rescue Purkinje cells and improve motor functions in a mouse model of cerebellar ataxia" Neurobiol Dis. 40:415---23. (2010)
- Kornek B, Storch MK, Weissert R et al. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. Am J Pathol 2000;157:267–276.
- Lassmann H. Mechanisms of demyelination and tissue destruction in multiple sclerosis. Clin Neurol Neurosurg 2002;104:168–171.
- Mahmood A, Lu D, Wang L Chopp M. Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury. J Neurotrauma 2002;19:1609–1617.
- Matsushima GK, Morrell P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study

demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol* 2001;11:107-116.

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–147.
- Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 2003;422:688–694
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71–74.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000;164:247–256.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000;61:364–370.
- Zhang J, Li Y, Chen J et al. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Exp Neurol* 2005;195:16–26