

TRASPLANTE DE CELULAS NERVIOSAS EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

ALEJANDRO D. JOSIOWICZ^{1, 2}, EUGENIA SACERDOTE DE LUSTIG¹

¹ Departamento de Investigación, Instituto de Oncología Angel H. Roffo; ² Departamento de Virología INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires

Resumen Este artículo es una revisión bibliográfica acerca de los avances científicos sobre el trasplante de tejido nervioso, tanto en animales de experimentación como en humanos, para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, particularmente en la enfermedad de Parkinson. Los datos muestran la posibilidad que tiene el trasplante de tejido nervioso de aliviar los síntomas típicos de algunas de estas enfermedades que afectan al sistema nervioso. Desde las primeras investigaciones en 1890 hasta la actualidad ha habido un importante progreso en este campo. Los datos aquí presentados llevan a pensar que el trasplante de tejido nervioso podría realizarse en la práctica clínica como actualmente se realizan otros trasplantes de tejido.

Abstract *Nervous tissue transplantation in neurodegenerative diseases.* This article is a bibliographic review concerning the scientific advances in nervous tissue transplantation in experimental animals and in humans as applied to neurodegenerative diseases, particularly Parkinson's disease. Data show the possibility that the transplantation of nervous tissue may alleviate the typical symptoms of some of these diseases. Since the first trials in 1890, there has been a remarkable progress in this field, encouraging the idea that nervous tissue transplantation may be considered in clinical practice.

Key words: neurotransplantation, neurodegenerative diseases

El trasplante de órganos provenientes de enfermos terminales con muerte neurológica comprobada, ya está permitido en un gran número de países. Además del órgano entero, el trasplante de células y tejidos con funciones específicas como hepatocitos, o islotes de Langerhans del páncreas, representa un importante avance médico. En el caso de falta de órganos humanos, se ha recurrido al xenotrasplante de células animales encapsuladas en membranas semipermeables que impiden el rechazo violento provocado por el sistema inmunitario. Este método permite mantener la función hasta el momento de la recepción de un órgano humano. Respecto al trasplante de tejido nervioso, los datos experimentales recogidos en estos últimos 15 años se refieren particularmente a ratas y monos en los cuales se ha provocado artificialmente una lesión de cerebro con distintos métodos y luego se ha intentado restituir, con un trasplante, la función del órgano.

En humanos el último descubrimiento de Erikson et al.¹, respecto a la capacidad reproductiva de determina-

das células del hipocampo en el cerebro adulto humano, abre nuevas perspectivas en el campo de los neurotrasplantes. Para simular en los animales lo que pasa en las enfermedades neurodegenerativas humanas se puede producir una injuria en un punto determinado del cerebro de un animal de laboratorio. La injuria puede ser mecánica, aspirando la zona que se va a estudiar o provocando una lesión con un neurotóxico. Son muchas las drogas que se han utilizado para destruir, por ejemplo, el tejido colinérgico, que tanta importancia tiene en la enfermedad de Alzheimer. Algunas de ellas, como el ácido kaínico, son específicas para reducir la actividad del hipocampo, así como la neurotoxina AF64A, el hemicolinum HC3² que tiene afinidad para la colina, la saponina IgG 192, una inmunotoxina que ataca las neuronas colinérgicas, o los inhibidores específicos de la acetilcolina.

Respecto a la fuente del tejido que se va a implantar en el sitio lesionado, puede tratarse de un autotrasplante o de un heterotrasplante (generalmente de células embrionarias) o de un xenotrasplante, cuando la fuente celular proviene de otra especie. El autotrasplante consiste en la utilización de neuronas colinérgicas periféricas, o fibroblastos propios que expresan el gen de la acetilcolina, lo que ya ha sido realizado en modelos de Alzheimer³. También las células del estroma de la médula espinal, que son células pluripotentes, inoculadas

Recibido: 8-IX-1999

Aceptado: 22-III-2000

Dirección postal: Dra. Eugenia Sacerdote de Lustig, Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Avda. San Martín 5481, 1417 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4580-2811

e-mail: invroffo@fmed.uba.ar

en el cerebro, pueden diferenciarse en neuronas, cuando son estimuladas por factores de crecimiento nervioso y ácido retinoico. Se ha confirmado su presencia con anticuerpos contra antígenos específicos neuronales y proteínas asociadas a microtúbulos.

Respecto al xenotrasplante, LeBlanc et al.⁴ utilizan neuronas colinérgicas porcinas y las injertan en el hipocampo de ratas tratadas anteriormente con inmunotoxina. Los autores observan un crecimiento de neuronas colinérgicas xenogénicas y una modificación del déficit espacial producido por la lesión. Vale la pena señalar que en mayo de 1999 la FDA (*Food and Drug Administration*) de EE.UU. autorizó a una firma farmacéutica de Boston a implantar células nerviosas porcinas en el cerebro de un enfermo con un proceso neurodegenerativo. Hasta ahora ningún otro país otorgó este permiso en humanos.

Respecto al tejido colinérgico, en 1989 Bond et al.⁵ efectuaron un trasplante de la región septohipocámpal del cerebro en ratas con déficit colinérgico tipo Alzheimer y estudiaron la viabilidad del trasplante. Muir et al.² en 1992, trasplantaron tejido embrionario colinérgico en la corteza de ratas tratadas anteriormente con bloqueantes de la colina y encontraron mejoría. En el mismo año Walsh et al.⁶ observaron que el trasplante de neuronas fetales colinérgicas en el hipocampo reducía la aberración neurológica inducida por la neurotoxina AF64A.

Además del trasplante de tejido embrionario de la misma especie, se ha utilizado el xenotrasplante de tejido humano en cerebro de ratas que habían sido inmunosuprimidas con ciclosporina. Li et al en 1994⁷ trasplantaron en el hipocampo de rata células colinérgicas de feto humano para mejorar lesiones provocadas artificialmente en fornix de rata, y Geny et al.⁸ estudiaron la formación de nuevos vasos en los trasplantes de neuronas humanas en cerebro de rata inmunosuprimida con ciclosporina. A pesar de la confirmación de la supervivencia de las células neuronales, la neovascularización tarda 3 meses en realizarse plenamente a causa del escaso grado de maduración del tejido implantado. Sprick et al.⁹ injertaron en ratas una suspensión de células del hipocampo lesionado con ácido kaínico, mientras que Chiu et al. en 1998¹⁰ trasplantaron células cultivadas y purificadas del hipocampo de un feto humano de 20 semanas en el striatum lesionado de rata y confirmaron a nivel ultraestructural la integración entre los 2 tejidos.

La experiencia recogida señala además la importancia de los factores de crecimiento como coadyuvantes del injerto cerebral. Se pueden agregar al momento del injerto pequeños pellets que liberan lentamente NGF (factor de crecimiento nervioso), o la neurokinina (sustancia P) que mejoran la conducta de los animales lesionados en el hipocampo y promueven la supervivencia de las células trasplantadas especialmente de las neuronas colinérgicas. En lugar de infiltrar directamente el cerebro con NGF, Blesh

y Tuszynski¹¹ prepararon transgénicamente fibroblastos autólogos con el gen del NGF y luego los injertaron en cerebro donde siguieron liberando el factor de crecimiento. Tuszynski et al.¹² en 1996 no sólo modificaron genéticamente fibroblastos de ratas y monos sino que además transformaron fibroblastos humanos con vectores retrovirales para producir NGF. Estas células modificadas persistieron hasta 6 meses después de haber sido inyectadas en el cerebro del primate adulto. Las fibras colinérgicas del huésped (monos cynomolgus o Rhesus) penetraron en el implante de fibroblastos secretantes de NGF, especialmente si se trataba de tejido autólogo. Bankiewicz et al.¹³ observaron que fibroblastos autólogos de monos con el gen de la tirosina hidroxilasa podían seguir expresando la enzima hasta 4 meses después del trasplante. Además, otros factores de crecimiento pueden ayudar al implante cerebral, como BMP (*bone morphogenetic protein*), el BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), el FGF (*fibroblast growth factor*). Últimamente se ha agregado al uso de factores de crecimiento una estrategia para evitar el rechazo de las células implantadas utilizando las células de Sertoli que proveen protección inmune y fuerte soporte nutritivo¹⁴.

La experiencia adquirida con ratas y primates no humanos en estos últimos 15 años ha llevado a los investigadores, a partir de 1992, a considerar la posibilidad de utilizar el trasplante de neuronas heterólogas en varias enfermedades neurodegenerativas humanas, como el Parkinson, el Alzheimer y la enfermedad de Huntington. La enfermedad de Parkinson es debida a la pérdida de una pequeña población de células que producen la dopamina, un neuromodulador esencial, que al inicio de la enfermedad puede ser substituido por L-Dopa, pero ya sin efecto en los casos avanzados. Esta etapa de la enfermedad sería la más indicada para recibir un trasplante de células embrionarias humanas. En este campo ya existen varios intentos de trasplante. Rosenfeld¹⁵ en 1993 utilizó con este propósito tejido de 3-4 fetos de 6.5 a 8 semanas para implantarlos en putamen y núcleo caudato. Emerich et al.¹⁶ sugirieron utilizar en lugar de tejido entero, una suspensión celular encapsulada en un polímero, que sirve como barrera semipermeable con propiedades inmunoprotectoras, que permite el ingreso de sustancias nutritivas y salida de moléculas neurotransmisoras. Philpott et al.¹⁷ en 1997 trasplantaron a pacientes de Huntington células fetales humanas de tejido proveniente del núcleo estriado. A los 6 meses de la cirugía, los enfermos presentaban evidente mejoría cognitiva. White et al.¹⁸ en 1999 aconsejaron el cultivo de células fetales humanas, pero provenientes de embriones del segundo trimestre, en cuanto éstos contienen células progenitoras neuronales que más fácilmente se reproducen en el huésped.

A pesar que el trasplante de tejido embrionario ha sido utilizado hasta ahora particularmente en Parkinson,

Shannon et al.¹⁹ en 1996 han trabajado con modelos de la enfermedad de Huntington en primates no humanos, que presentaban sintomatología neurodegenerativa de tipo motor y cognitivo, realizando el trasplante del núcleo estriado fetal. En abril de 1999 Stanley et al.²⁰ presentaron en un congreso de neurología un estudio doble ciego con 20 pacientes de Parkinson que habían recibido cada uno un trasplante de tejido mesencefálico de 4 embriones humanos; los enfermos fueron evaluados a los 4, 8 y 12 meses y comparados con 20 pacientes que habían sufrido igual trauma de la perforación craneana pero que no habían recibido el tejido embrionario. Para evaluar con más exactitud el éxito del trasplante, se determinó en distintos tiempos la reducción de la dosis de levodopa necesaria para aliviar la sintomatología del Parkinson. Se compararon los videos de enfermos que mostraban el grado de problemas motores y cognitivos antes y después del tratamiento, y se analizó la incorporación de fluorodopa en el núcleo estriado en distintos tiempos post-trasplante. Naturalmente, estos datos se completaron con pruebas psicológicas. Están a disposición ahora sistemas computarizados para evaluar rápidamente con alta precisión las varias características clínicas evolutivas de los enfermos trasplantados con una suspensión de neuronas, o con un núcleo cerebral entero.

Entre las complicaciones de los trasplantes de determinadas zonas cerebrales se debe tener en cuenta que se puede producir un desequilibrio entre los varios neurotransmisores, porque a veces el implante embrionario libera un exceso de un tipo de neurotransmisor a expensas de otros, lo que empeora el estado del organismo trasplantado.

Naturalmente, la forma de evaluar el resultado del implante en animales de laboratorio es distinto de las pruebas utilizadas en humanos. En el laboratorio experimental se ha utilizado: 1) la histología³, que con un sistema de marcado adecuado (por ejemplo: marca fluorescente, gen reporter) permite observar a nivel microscópico la integración, desarrollo, y sobrevivencia de las células implantadas en el hospedador; 2) con microscopía electrónica²¹ se puede determinar a nivel ultraestructural la formación de sinapsis; 3) con microdiálisis²² se puede medir la liberación del neurotransmisor propio de las células implantadas, correlacionándolo con la presencia y actividad del implante y 4) en vivo con pruebas comportamentales^{4, 23, 24, 25}, que permiten comparar la actividad motora o cognitiva antes y después del trasplante.

Para estudiar los efectos del trasplante en la conducta del animal, muchos autores han utilizado la siguiente estrategia: 1) producir mediante una lesión alteraciones de comportamiento en un animal de laboratorio, 2) implantar las células en la región lesionada y 3) mediante pruebas determinar la mejoría en el comportamiento, a través del tiempo.

Debido a la complejidad de las enfermedades neurodegenerativas, un modelo animal no ha podido reproducir el rango completo de los efectos de todas las enfermedades neurológicas. Es por ello que se han ideado distintos modelos, los cuales permiten evaluar el éxito del trasplante.

Los modelos más utilizados para simular la enfermedad de Alzheimer son los que reproducen la pérdida de neuronas colinérgicas, observada en esta enfermedad. Esto se logra, como ya se mencionó, mediante una lesión mecánica²², química²⁶, o inmunológica³. En la enfermedad de Parkinson las neurotoxinas más usadas son 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP), en monos²⁶, y la 6-hidroxidopamina (6-HODA) en modelos roedores^{27, 28}. Para evaluar el comportamiento de los animales trasplantados se usan diferentes pruebas, siendo la más común la de Morris. Esta prueba analiza la memoria y aprendizaje espacial: el animal aprende a utilizar señales distantes para localizar una plataforma sumergida en un piletón con agua opaca²⁹.

Concluyendo, los trasplantes cerebrales pueden actuar substituyendo el daño cerebral con la liberación de neurotransmisores o simplemente por medio de la liberación de factores tróficos o activando nuevas conexiones neuronales. Los resultados experimentales obtenidos hasta ahora con implantes neuronales en primates no humanos y ratas, sugieren que se podría aplicar estas técnicas en varias enfermedades neurodegenerativas humanas. El trasplante neuronal en humanos tiene un futuro promisorio, pero todavía falta perfeccionar la elección del tejido a trasplantar, la técnica del implante para que sea lo menos traumática posible, el tipo de trasplante (tejido entero o suspensión celular), la forma de injertarlo y el grado de rechazo. Pero sobre todo hay que superar los problemas éticos relacionados con el uso de embriones humanos o de células nerviosas porcinas, que ya se utilizan para otros tipos de órganos trasplantados en el hombre.

Bibliografía

1. Eriksson E, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med* 1998; 4: 1313-7.
2. Muir JL, Dunnett SB, Robbins TW, Everitt BJ. Attentional functions of the forebrain cholinergic systems: effects of intraventricular hemicholinium, physostigmine, basal forebrain lesions and intracortical grafts on a multiple-choice serial reaction time task. *Exp Brain Res* 1992; 89: 611-22.
3. Itakura T, Umemoto M, Kamei I, et al. Autotransplantation of peripheral cholinergic neurons into the brains of Alzheimer model rats. *Acta Neurochir (Wien)* 1992; 115: 127-32.
4. LeBlanc CJ, Deacon TW, Whatley BR, Dinsmore J, Lin L, Isacson O. Morris water maze analysis of 192-IgG-saporin-lesioned rats and porcine cholinergic transplants to the hippocampus. *Cell Transplant* 1999; 8: 13-42.

5. Bond NW, Walton J, Pruss J. Restoration of memory following septo-hippocampal grafts: a possible treatment for Alzheimer's disease. *Biol Psychol* 1989; 28: 67-87.
6. Walsh TJ, Opello KD. Neuroplasticity, the aging brain, and Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 1992; 13: 101-10.
7. Li YJ, Conrad JA, Low WC. Transplantation of cholinergic-rich spinal tissue from spontaneously aborted human fetuses into a rodent model of Alzheimer's disease. *Transplant Proc* 1994; 26: 3336-7.
8. Geny C, Naimi-Sadaoui S, Jeny R, Belkadi AM, Juliano SL, Peschanski M. Long-term delayed vascularization of human neural transplants to the rat brain. *J Neurosci* 1994; 14: 7553-62.
9. Sprick U, Hasenohr RU, Krauth J, Klapdor K, Huston JP. Effects of chronic substance P treatment and intracranial fetal grafts learning after hippocampal kainic acid lesion. *Peptides* 1996; 17: 275-85.
10. Chiu FC, Potter PE, Rozental R. Purification of human fetal hippocampal neurons by flow cytometry for transplantation. *Methods* 1998; 16: 260-7.
11. Blesch A, Tuszynski M. Ex vivo gene therapy for Alzheimer's disease and spinal cord injury. *Clin Neurosci* 1995-96; 3: 268-74.
12. Tuszynski MH, Roberts J, Senut MC, U HS, Gage FH. Gene therapy in the adult primate brain: intraparenchymal grafts of cells genetically modified to produce nerve growth factor prevent cholinergic neuronal degeneration. *Gene Ther* 1996; 3: 305-14.
13. Bankiewicz KS, Leff SE, Nagy D, et al. Practical aspects of the development of ex vivo and in vivo gene therapy for Parkinson's disease. *Exp Neurol* 1997; 144: 147-56.
14. Willing AE, Sudbery JJ, Othberg AI, et al. Sertoli cells decrease microglial response and increase engraftment of human hNT neurons in the hemiparkinsonian rat striatum. *Brain Res Bull* 1999; 48: 441-4.
15. Rosenfeld JV. Current issues in neural transplantation. *Ann Acad Med Singapore* 1993; 22: 464-9.
16. Emerich DF, Winn SR, Christenson L, Palmatier MA, Gentile FT, Sanberg PR. A novel approach to neural transplantation in Parkinson's disease: use of polymer-encapsulated cell therapy. *Neurosci Biobehav Rev* 1992; 16: 437-47.
17. Philpott LM, Kopyov OV, Lee AJ, et al. Neuropsychological functioning following fetal striatal transplantation in Huntington's chorea: three case presentations. *Cell Transplant* 1997; 6: 203-12.
18. White MG, Hammond RR, Sanders VJ, et al. Neuron-enriched second trimester human cultures: growth factor response and in vivo graft survival. *Cell Transplant* 1999; 8: 59-73.
19. Shannon KM, Kordower JH. Neural transplantation for Huntington's disease: experimental rationale and recommendations for clinical trials. *Cell Transplant* 1996; 5: 339-52.
20. Stanley F, Greene PE, Tsai W, et al. Double-blind controlled trial of human embryonic dopaminergic tissue transplants in advanced Parkinson's disease: Clinical outcomes. *Neurol* 1999; 52 (suppl 2): A405.
21. Leranath C, Sladek JR Jr, Roth RH, Redmond DE Jr. Efferent synaptic connections of dopaminergic neurons grafted into the caudate nucleus of experimentally induced parkinsonian monkeys are different from those of control animals. *Exp Brain Res* 1998; 123: 323-33.
22. Nilsson OG, Kalén P, Rosengren E, Björklund A. Acetylcholine release from intrahippocampal septal grafts is under control of the host brain. *Proc Natl Soc Sci USA* 1990; 8: 2647-51.
23. Dyon-Laurent C, Herve A, Sara SJ. Noradrenergic hyperactivity in hippocampus after partial denervation: pharmacological, behavioral, and electrophysiological studies. *Exp Brain Res* 1994; 99: 259-66.
24. Hudson JL, Levin DR, Hoffer BJ. A 16-channel automated rotometer system for reliable measurement of turning behavior in 6-hydroxydopamine lesioned and transplanted rats. *Cell Transplant* 1993; 2: 507-14.
25. Winkler C, Bentlage C, Nikkahah G, Samii M, Björklund A. Intranigral transplants of GABA-rich striatal tissue induce behavioral recovery in the rat Parkinson model and promote the effects obtained by intra-striatal dopaminergic transplants. *Exp Neurol* 1999; 155: 165-86.
26. Emerich DF, Black BA, Kessler JP, Cotman CW, Walsh TJ. Transplantation of fetal cholinergic neurons into the hippocampus attenuates the cognitive and neurochemical deficits induced by AF64A. *Brain Res Bull* 1992; 28: 219-26.
27. Mokry J. Experimental models and behavioural tests used in the study of Parkinson's disease. *Physiol Res* 1995; 44: 143-50.
28. Olsson M, Nikkahah G, Bentlage C, Björklund A. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping tests. *J Neurosci* 1995; 15: 3863-75.
29. Wolfer DP, Stagliar-Bozicevic M, Errington ML, Lipp HP. Spatial Memory and Learning in Transgenic Mice: Fact or Artifact? *News Physiol Sci* 1998; 13: 118-123.

Por mi parte, siempre he estimado como una inmensa felicidad el poder dedicarse íntegramente a una actividad que nos apasiona. Y, todavía, conseguir que nos paguen por ello.

Bernardo A. Houssay (187-1971)

Misión y responsabilidad del investigador científico, 1961, *reproducida en Ciencia e Investigación* 1996; 49: 105-110