

Transdiferenciación neuronal de células madre mesenquimales de médula ósea humana

Neuronal transdifferentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells

Unidad de Investigación Neurociencias
de la FUNDACIÓN MAPFRE-MEDICINA.
Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid.

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

RESUMEN

En el presente estudio se muestra la posibilidad de lograr una transdiferenciación de células madre mesenquimales humanas, obtenidas del estroma de médula ósea, hacia neuronas adultas. Los resultados obtenidos confirman experiencias previas acerca de que las células madre del estroma de la médula ósea experimentan cambios fenotípicos y expresan marcadores de diferenciación neuronal cuando se cultivan in vitro con determinadas sustancias químicas. Por otra parte, el presente estudio demuestra que la transdiferenciación neuronal de estas células puede ser obtenida también por medio de un co-cultivo con células de Schwann. La transdiferenciación en co-cultivo comienza más tardíamente, y aunque la expresión de nestina, como primer marcador neural, se observa ya a las 4 horas del co-cultivo, esta expresión disminuye entre las 24 y 72 horas, momento en que comienzan a observarse células con expresión de marcadores de diferenciación neuronal, aumentando progresivamente el número de células que expresan Enolasa específica neuronal, Proteína de neurofilamentos y Beta-tubulina.

Palabras clave: *Células madre adultas, células madre mesenquimales, transdiferenciación neuronal.*

Zurita M, Vaquero J, Oya S, Aguayo C
Transdiferenciación neuronal de células madre mesenquimales de médula ósea humana
Mapfre Medicina, 2005; 16: 167-173

ABSTRACT

This study describes the possibility to obtain neuronal transdifferentiation of human mesenchymal stem cells, obtained from the bone marrow stroma. Our present results confirm previous experiences showing that these cells express markers of neuronal differentiation when they are cultured with certain chemical factors. On the other hand, the present study demonstrates that a neuronal transdifferentiation of these cells can also be obtained by means of a co-culture with Schwann cells. In co-culture, transdifferentiation begins later, although nestin expression is first observed 4 hours after beginning the co-culture, it decreased between 24 and 72 hours, and at this time, a clear increase in the number of NSE, NF and beta-tubulin-positive cells, can be seen.

Key words: *Adult stem cells, mesenchymal stem cells, neuronal transdifferentiation.*

Zurita M, Vaquero J, Oya S, Aguayo C
Neuronal transdifferentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells
Mapfre Medicina, 2005; 16: 167-173

Correspondencia:

Jesús Vaquero
Hospital Puerta de Hierro
28035 Madrid
E-mail: jvaquero@telefonica.net

Fecha de recepción: 13 de diciembre de 2004

Este trabajo ha sido realizado por medio de una Beca de Investigación de la FUNDACIÓN MAPFRE-MEDICINA. 2004.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha existido un creciente interés por las células madre y su posible potencial terapéutico. Los resultados experimentales que se están obteniendo en este campo nos hacen pensar en una posible aplicación no muy lejana de estas técnicas para paliar determinadas enfermedades en el hombre.

Las células madre embrionarias son las más pluripotenciales, teniendo una gran capacidad para proliferar *in vitro* y manteniendo esa pluripotencialidad así como la posibilidad de diferenciarse hacia una gran variedad de líneas celulares. Sin embargo, en los últimos años, debido a que se han planteado numerosos problemas éticos y legales para su utilización se han empezado a utilizar como alternativa para futuras aplicaciones terapéuticas las células madre adultas, que parecen representar una opción muy prometedora. Las células madre adultas pueden obtenerse de distintos tejidos, por ejemplo, en el Sistema Nervioso Central (SNC) adulto existen células madre multipotenciales que además de originar células gliales también tienen capacidad de originar neuronas. Estas células van a realizar 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 glia (astroglia y oligodendroglia) y la otra quedará con las mismas características de las células progenitoras. Estas características de autorrenovación y pluripotencialidad definen a las células madre de un órgano determinado.

En la actualidad, una de las fuentes más utilizadas para la obtención de células madre adultas es el estroma de la médula ósea (células mesenquimales, células del estroma de la médula ósea o unidad formadora de colonias fibroblásticas) las cuales se pueden expandir *in vitro* con relativa facilidad y a la vez diferenciarse en múltiples tipos de células, mesenquimales o no, como adipocitos, condrocitos, osteocitos, hepatocitos, células cardíacas o incluso neuronas. Las células madre mesenquimales aisladas muestran multipotencialidad para diferenciarse en cultivo o tras su implante *in vivo*, en osteoblastos, condrocitos, adipocitos y mioblastos. Así, está demostrado que tras su infusión sistémica en animales de experimentación, estas células pueden ser detectadas en diferentes tejidos como hueso, cartílago, hígado, bazo o timo. Por otra parte en los últimos años, parece evidente,

que las células madre mesenquimales pueden sufrir también fenómenos de transdiferenciación, es decir, dar lugar a partir de ellas a la formación de células neuroepiteliales, así los modelos de transdiferenciación muestran cómo las células de la médula ósea pueden originar células neurales tanto *in vitro* como *in vivo*.

En 1997, Eglitis y Mezey (1) demostraron que las células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea de ratón y trasplantadas intravenosamente en ratones hembras sobreviven, migran rápidamente y se integran en el Sistema Nervioso, siendo más abundantes en aquellas zonas del parénquima donde existe mayor vascularización. En 1998, los trabajos de Azizi y cols. (2) demuestran que tras la infusión directa de células madre mesenquimales de ratas o humanas en ganglios basales de rata se observa cómo éstas se integran y migran en el tejido huésped, de forma similar a lo que ocurre cuando se inyectan astrocitos paraventriculares de rata, ya que éstos parecen tener algunas propiedades de las células madre neurales. A los 72 días de la inyección directa de células madre mesenquimales, los autores observan que las células son viables y no existen signos de respuesta inflamatoria o rechazo.

Cuando las células madre mesenquimales de médula ósea se inyectan en la región paraventricular de ratones jóvenes, éstas se diferencian en astrocitos y en neuronas (3). Esta capacidad de las células madre mesenquimales para interconvertirse con las células del SNC ha sido también señalada en los trabajos de Bjornson y cols. (4) al demostrarse que las células madre neurales pueden reconstituir el sistema hematopoyético en ratones.

La capacidad de las células madre mesenquimales del estroma de la médula ósea para diferenciarse *in vitro* hacia la línea neuronal queda bien demostrada en los trabajos de Sánchez-Ramos y cols. (5), o de Woodbury y cols. (6) quienes aseguran por primera vez que las células madre del estroma de médula ósea, tanto de humanos como de rata adulta, tras ser expandidas en cultivo durante más de 20 pases como células indiferenciadas, pueden ser inducidas a exhibir un fenotipo neural mediante un simple tratamiento químico, pasando a expresar ya a las 5 horas del tratamiento nestina y posteriormente marcadores neuronales, tales como la Enolasa específica neuronal o Proteína de Neurofilamentos, al menos en el 80% de las células.

Una de las utilidades de las células madre mesenquimales, debido a su capacidad de diferen-

ciarse hacia elementos neurales y su capacidad de migración, es la posibilidad de reconstruir las lesiones del SNC y concretamente la médula espinal. Esta utilidad se basa en la hipótesis de que los precursores de las células madre neurales pueden derivar de la médula ósea y por tanto cuando éstas se colocan en cultivo, bajo determinadas condiciones, se induce su diferenciación a células neurales. Teniendo en cuenta estas observaciones, el objetivo del presente estudio fue estudiar los mecanismos de transdiferenciación neuronal de células madre adultas mesenquimales obtenidas de médula ósea adulta humana, comparando la transdiferenciación que puede ser obtenida *in vitro* por medio de sustancias químicas, o bien por medio de su co-cultivo con células de Schwann.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras humanas fueron obtenidas de médula ósea tras punción esternal en el curso de intervenciones quirúrgicas que precisaron esternotomía, generalmente en la cirugía de revascularización miocárdica. El volumen aspirado de unos 5 cc se tomó con una aguja heparinizada (Heparina sódica 1000UI/ml, ROVI) específica para aspiración de médula ósea de los laboratorios Wacrees (ref. DBMNI1501). La muestra de médula ósea fue diluida en una proporción 1:1 en solución de Hank's o DMEM / 10% FBS.

Posteriormente, tras pasar varias veces la muestra a través de una aguja de insulina para eliminar los aglomerados celulares la muestra se filtró a través de un filtro de nylon de 70 micras para eliminar posibles restos óseos. Después, la muestra fue sometida a un gradiente de densidad. Para ello la muestra de médula ósea diluida se colocó en una proporción 1:2 ó 1:3 sobre una solución de Ficoll (Pharmacia). Por cada 9 cc de muestra se usaron 6cc de solución de Ficoll para eliminar células CD45 y glicoforina A positivas. Tras la centrifugación a 1500rpm durante 30 minutos se recogió el sobrenadante y la interfase, que se suspendió en HBSS o DMEM. Las células fueron centrifugadas de nuevo a 1000rpm durante 15 minutos y resuspendidas en 20 cc de medio alfa-MEM sin deoxiribonucleótidos ni ribonucleótidos, con un 20% de FBS, 100u/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina y 2mM L-Glutamina (GIBCO) y cultivadas en un frasco de cultivo de 75cm².

Para los estudios de diferenciación química las células fueron plaqueadas a una densidad de 2500 células/cm². El medio de cultivo (alfa-MEM/20% FBS) de las células madre mesenquimales (CMM) fue reemplazado 24 horas antes de la inducción neuronal por un medio de preinducción consistente en: DMEM con 20% de FBS y 1mM de 2-beta-mercaptoetanol. Probamos como segunda opción la preinducción con bFGF (10ng/ml) para ver si éste aumentaba la proporción de células con características «neurales». A las 24 horas, tras eliminar el medio de preinducción, las células fueron lavadas dos veces con PBS y para iniciar la diferenciación hacia un fenotipo neuronal y probamos, a lo largo del desarrollo del presente estudio, varias opciones: a) Las células fueron lavadas en PBS y transferidas 48 horas a un medio de inducción compuesto por DMEM sin suero, con una concentración entre 5-10mM Beta-mercaptoetanol (BME). b) Las células fueron lavadas en PBS y transferidas 48 horas a un medio DMEM con un 2% de DMSO y 200 µM de butylated hydroxyanisole (BHA). c) Co-cultivo de las células madre mesenquimales con células de Schwann humanas obtenidas a partir de nervio periférico adulto. Este protocolo se estableció ante la facilidad de obtener en los mismos pacientes que se intervienen con técnicas de by-pass para revascularización miocárdica, no solo células de médula ósea (punción esternal), sino también fragmentos de nervio safeno, generalmente obtenidos junto con la vena safena que se extrae para el by-pass coronario. La conveniencia de estudiar la posible transformación hacia un fenotipo neuronal de las células madre mesenquimales en presencia de células de Schwann se planteó ante las evidencias previas, obtenidas en nuestro laboratorio (7,8) a favor de que el cotrasplante intramedular de cerebro fetal y fragmentos de nervio periférico, en animales parapléjicos, aumenta la actividad proliferativa de células madre neurales endógenas, de origen ependimario.

Para los co-cultivos, se mantuvieron CMM y células de Schwann 30 días en cultivos separados. Después, las células se levantaron con 0.25% tripsina y 1mM EDTA, durante 5 minutos a 37°C, y las células se co-cultivaron en placas de Petri con 3ml de medio de DMEM/10%FBS. Los Co-cultivos se llevaron a cabo en una proporción 1:1 (500.000 CMM: 500.000 células de Schwann) y se estudiaron por inmunohistoquímica en momentos diferentes de evolución (4h, 12h, 24h, 72h y 1 semana) para estudiar el posible fenotipo cambiante de las CMM.

Para la caracterización inmunohistoquímica de CMM indiferenciadas y su diferenciación de otras células mesenquimales del estroma de médula ósea se realizaron estudios de marcaje con CD14 (1:40, NeoMarkers, Co, Fremont CA, EE.UU.); CD31 (1:100, NeoMarkers); CD34 (1:200, Master Diagnostica, Granada, España); CD45 (1:200, NeoMarkers); CD73 (1:100, Santa Cruz Inc., CA, EE.UU.); CD105 (5µg/ml, NeoMarkers); Vimentina (1:200, Master Diagnostica) y Fibronectina (1:300, NeoMarkers). Para el estudio de células de Schwann: S-100 (1:20, NeoMarkers). Para el estudio de diferenciación neuronal: NSE (1:800, NeoMarkers); NF-200 (1:500, Serotec, Kidlington, UK); nestina (1:50, Chemicon Int. Inc. Temecula CA, EE.UU.), y beta-tubulina (2µg/ml, NeoMarkers). Para el estudio de diferenciación astrogial: PGFA (2µg/ml, NeoMarkers). Para el estudio de posible diferenciación oligodendrogial: Mab1580 (1:200, Chemicon). Por lo menos para cada marcador celular, 10 campos microscópicos, a 100 x, se estudiaron en los diferentes momentos de cultivo (4h, 12h, 24h, 72h y 1 semana). En cada momento del estudio, el porcentaje de células inmunopositivas que fue cuantificado fue el valor medio de expresión inmunohistoquímica de cada marcador y como valor final se consideró el promedio de 10 experimentos repetidos de diferenciación química o biológica de las CMM humanas.

RESULTADOS

Las células madre mesenquimales obtenidas presentaban al inicio de los experimentos una típica morfología mesenquimal y positividad inmunohistoquímica a CD31, CD45, CD73, CD105, Vimentina y Fibronectina (Figura 1). La exposición de las CMM obtenidas de médula ósea humanas, a los medios químicos de preinducción e inducción usados provoca cambios morfológicos en las células. A las pocas horas de la exposición (4 horas) al beta-mercaptoetanol, los cuerpos celulares se retraen y emiten largas prolongaciones que finalizan en conos de desarrollo. Los mismos resultados se lograron con BHA, por lo cual se describirán conjuntamente los datos de diferenciación con BME y con BHA, refiriéndonos, en su conjunto, a «diferenciación química» en contraposición a «transdiferenciación biológica» a la que nos referiremos al describir los resultados obtenidos con el co-cultivo de las CMM con células de Schwann.

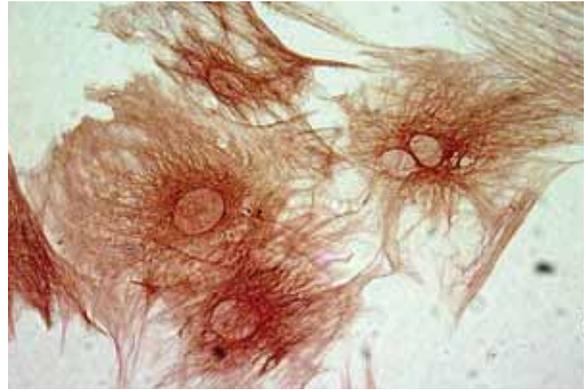


Figura 1. Típica morfología mesenquimal de las células madre del estroma de médula ósea humana, mostrando expresión inmunohistoquímica de CD 105.

Tratamientos de diferenciación neuronal con métodos químicos

La transición progresiva de las CMM indiferenciadas hacia una morfología neuronal coincide con el aumento de expresión de marcadores neuronales. Así, a la hora de la inducción ya hay células nestina positivas ($30 \pm 8\%$) y a las 4 horas aumentan a un $67 \pm 8\%$. A las 8 horas existen $13 \pm 3.1\%$ de células nestina y aparecen células NSE positivas ($35 \pm 8\%$) que a las 24 horas son de un $64 \pm 4.7\%$. A las 24 horas también se detectan células positivas para NF-200 ($61 \pm 31.2\%$) y beta-tubulina ($47 \pm 8\%$). A las 72 horas no existen claramente células nestina positivas y aparecen mayoritariamente células NSE ($80 \pm 14.1\%$), NF-200 ($81 \pm 7.23\%$) y beta-tubulina ($78 \pm 6.7\%$).

A la semana del tratamiento encontramos un $81.9 \pm 8.20\%$ de células NSE positivas, $86.3 \pm 5.7\%$ de células NF-200 positivas y $88.2 \pm 4.6\%$ células beta-tubulina positivas. La expresión de CD105, CD73, vimentina y de fibronectina dejó de observarse a las 24 horas de la inducción. Por otra parte estos cultivos se mantuvieron en todo momento CD45 y CD34 negativos. Todos nuestros cultivos fueron negativos para la PGFA y para el marcador de oligodendrocitos MAB1580.

Transdiferenciación neuronal de CMM por medio del co-cultivo con células de Schwann

El cocultivo de CMM humanas con células de Schwann (proporción 1:1) provoca cambios morfológicos y fenotípicos en las CMM compatibles con un fenotipo neuronal. Las células de

Schwann no parecen sin embargo alterar su morfología ni su expresión a la S-100.

Las células neurales producidas en cocultivo no mostraron rápidamente morfología de neuronas o glia adulta. Se comenzaron a ver cambios morfológicos importantes en un alto número de CMM, sugerentes de diferenciación neuronal a la semana del cultivo, aunque mucho antes se comenzaron a identificar marcadores de la línea neuronal.

A la hora de iniciar el co-cultivo encontramos un 50% de células positivas a la vimentina, fibronectina, CD105 y CD73 positivas y un 45-50% de células S-100 positivas (todas nestina negativas). Los controles a la hora eran: cultivos puros de Schwann S-100 positivos, y cultivos de CMM Vimentina, CD105, CD73 y fibronectina positivos así como, S-100 negativas. Ambos eran nestina negativos (CMM: 5% células positivas a la nestina).

A las 4 horas del co-cultivo los resultados fueron similares a los encontrados a la hora, con la diferencia de que se observó un 10% de células nestina positivas. A las 8 horas se identificó un $10 \pm 5\%$ de células nestina positivas que presentaban morfología típica de CMM y no de células de Schwann.

Entre las 12 y 24 horas aumentó el número de células nestina positivas. Cabe destacar que a las 72 horas del co-cultivo desapareció totalmente la positividad a la vimentina, disminuyó la positividad a la nestina ($5 \pm 0.9\%$) y comenzaron a identificarse células NF-200 positivas ($25 \pm 5\%$), NSE positivas ($35 \pm 6.5\%$), beta-tubulina positivas ($34 \pm 8\%$), siendo negativa siempre la expresión de PGFA y Mab1580. Un $45 \pm 7.4\%$ de células mantuvieron positividad a la S-100. A la semana del co-cultivo los cambios morfológicos fueron muy evidentes y las células ya no expresaban nestina, pero sí NSE ($60 \pm 5.2\%$), NF-200 ($52 \pm 6.4\%$), beta-tubulina ($34 \pm 1.05\%$). El $27,8 \pm 8.1\%$ de las células eran S-100 positivas y tampoco encontramos células PGFA ni Mab850 positivas. A las dos semanas, los resultados fueron similares a los observados tras una semana de co-cultivo. La Figura 2 muestra cambios progresivos del fenotipo de las CMM humanas por medio del co-cultivo con células de Schwann y la Figura 3 muestra el diferente ritmo de transdiferenciación neuronal de las CMM humanas según que se utilicen métodos químicos o el co-cultivo con células de Schwann.

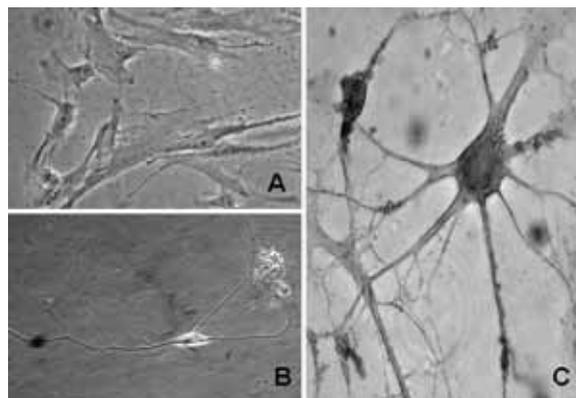


Figura 2. Proceso de transdiferenciación neuronal de CMM humanas a partir un co-cultivo con células de Schwann. A: Típico aspecto de las CMM humanas en cultivo. B: Célula de Schwann en cultivo, mostrando su típica morfología alargada. C: Típico aspecto neuronal de las CMM, tras una semana de co-cultivo con células de Schwann.

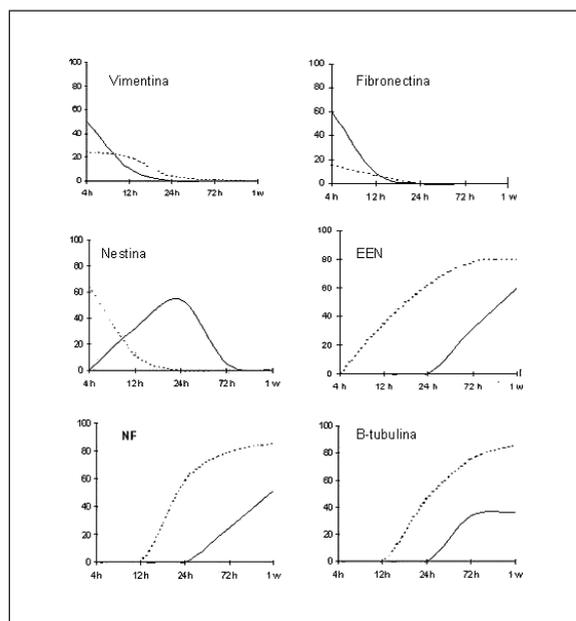


Figura 3. Gráficas que muestran el porcentaje (valores medios) de CMM que expresan los diferentes marcadores a lo largo del tiempo, según que la transdiferenciación a neuronas se realice con métodos químicos (línea de puntos) o por medio del co-cultivo con células de Schwann (línea continua). La transdiferenciación en co-cultivo comienza más tardíamente, y aunque la expresión de nestina, como marcador neuronal inicial, se observa ya a las 4 horas del co-cultivo, esta expresión disminuye entre las 24 y 72 horas, momento en que comienzan a observarse células con expresión de marcadores de diferenciación neuronal, incrementándose progresivamente la expresión de Enolasa específica neuronal (EEN) Proteína de neurofilamentos (NF) y Beta-tubulina.

DISCUSIÓN

Los hallazgos que hemos resumido reflejan el resultado promedio de 10 experimentos de diferenciación química o biológica de CMM humanas. Las técnicas de diferenciación neuronal de CMM por medios químicos son análogos a los obtenidos previamente por otros autores estudiando CMM murinas (6). Sin embargo, creemos importante la obtención de diferenciación neuronal de CMM por medios biológicos, ya que nuestro estudio permite demostrar que el co-cultivo de CMM en presencia de células de Schwann consigue que las CMM se diferencien a típicas células neuronales. Es posible que este resultado sea posible por la conocida liberación de factores tróficos a partir de las células de Schwann (7,8) pero la frecuente observación de contactos entre células de Schwann y CMM lleva a plantear la importancia de este tipo de contactos en los co-cultivos. Para dilucidar esta cuestión se desarrolla actualmente un estudio en nuestro laboratorio utilizando filtros biológicos que permiten en los co-cultivos el paso de factores tróficos, pero no de células.

Nuestros presentes hallazgos permiten ofrecer datos en la problemática, expuesta recientemente por diferentes autores, respecto a que la transdiferenciación neuronal de las CMM lograda por métodos químicos podría ser un artefacto técnico, por alteración química del citoesqueleto. No obstante, las «neuronas-like» así originadas parecen mostrar signos fisiológicos de funcionalidad (9) y el hecho de que en nuestro estudio hayamos logrado transdiferenciación sin el empleo de sustancias químicas parece cuestionar la hipótesis de que la diferenciación química logra un aspecto seudoneuronal debido a un artefacto del citoesqueleto de las células mesenquimales. Por otra parte, el problema de que la morfología neuronal obtenida pudiera corresponder a las células de Schwann y no a las CMM, se ha obviado en nuestro estudio por el hecho de que las células de Schwann mantienen en todo momento su expresión de S-100 y por el marcaje nuclear con bisbenzimidá que hemos realizado en algunos de los experimentos, lo que permite su constante identificación.

La principal conclusión de nuestras presentes observaciones radica en la demostración de que es posible una transdiferenciación hacia neuronas de células madre adultas mesenquimales obtenidas de médula ósea humana. Hemos con-

firmado que esta diferenciación puede ser lograda por métodos químicos, como ya han descrito previamente otros autores, pero, basándonos en nuestros resultados, también puede ser lograda por un método relativamente sencillo, de tipo biológico, y consiste en co-cultivar las células madre mesenquimales adultas, obtenidas de médula ósea, junto con células de Schwann obtenidas de la vaina de los nervios periféricos. Estos resultados son completamente superponibles a los obtenidos, en un estudio paralelo realizado en nuestro laboratorio, utilizando CMM de origen murino.

En cualquier caso, estos hallazgos nos llevan a suponer que en los estudios de regeneración nerviosa en los que nos planteemos la utilización de CMM, no es necesario transdiferenciar *in vitro* estas células antes de su aplicación en el SNC lesionado, ya que, teniendo en cuenta nuestros presentes resultados, es lógico esperar que la transdiferenciación pueda ser lograda *in vivo* y localmente, por los factores tróficos presentes en el medio donde se implanten dichas células. Esta hipótesis se está viendo comprobada por estudios en curso, que permiten obtener clara recuperación funcional, motora y sensitiva, en ratas parapléjicas crónicas sometidas al trasplante de CMM en las cavidades traumáticas centromedulares (10).

En cualquier caso, nuestro presente estudio apoya el concepto de transdiferenciación neuronal de células madre mesenquimales y demuestra que las CMM humanas pueden transdiferenciarse a neuronas por medio del co-cultivo con células de Schwann. Todo ello lleva a continuar los estudios dedicados a conocer la utilidad del trasplante de CMM en lesiones del Sistema Nervioso.

BIBLIOGRAFÍA

1. EGLITIS M, MEZEY E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 4080-4085.
2. AZIZI S A, STOKES D, AUGELLI B J, DIGIROLANO C, PROCKOP D J. 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.
3. KOPEN G C, PROCKOP D J, PHINENY D G. 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.

4. BJORNSON C R, RIETZE R L, REYNOLDS B A, MAGLI M C, VESCOVI A L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 1999; 283: 534-537.
5. SANCHEZ-RAMOS J, SONG S, CARDOZO-PELAEZ F, STEDEFORDT, WILLING A, FREEMANT B, SAPORTA S, JANSSEN W, PATEL N, COOPER D R, SANBERG P R. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000; 164: 247-256.
6. WOODBURY D, SCHWARZ E J, PROCKOP D J, BLACK I B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate to neurons. *J Neurosci Res*. 2000; 61: 364-370.
7. ZURITA M, VAQUERO J, OYA S. Grafting of neural tissue in chronically injured spinal cord: influence of the donor tissue on regenerative activity. *Surg Neurol*. 2000; 54: 117-25.
8. ZURITA M, VAQUERO J, OYA S, MONTILLA J. Functional recovery in chronic paraplegic rats after co-grafts of fetal brain and adult peripheral nerve tissue. *Surg Neurol*. 2001; 55: 249-254.
9. DEZAWA M, KANNO H, HOSHINO M, CHO H, MATSUMOTO N, ITOKAZUY,TAJIMA N, YAMADA H, SAWADA H, ISHIKAWA H, MIMURA T, KITADA M, SUZUKI Y, IDE C. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest*. 2004; 113: 1701-1710.
10. ZURITA M, VAQUERO J. Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation. *NeuroReport*. 2004; 15: 1105-1108.



XX Curso de Avances en Neumología Vall d'Hebron y Simposium Internacional sobre Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa

Fecha: del 22 al 24 de febrero de 2006

Horario: miércoles de 15.00 a 20.00 horas
jueves de 8.30 a 19.30 horas
viernes de 8.30 a 19.30 horas

Lugar: Sala de actos del Pabellón Docente
Hospital Universitari Vall d'Hebron
Barcelona

Información e inscripciones: Secretaría
Servicio de Neumología
Hospital General Vall d'Hebron
Passeig Vall d'Hebron, 119-129
085035 Barcelona
Tel.: 93 274 61 57
Tel. y fax: 93 274 60 83
e-mail: pneumo@vhebron.net
Horario de secretaría: de lunes a viernes de 8.00 a 17.00 horas