



ORIGINAL

Estudio de la utilidad del gel de fibrina como soporte celular en el trasplante intracerebral de células madre mesenquimales

Study of the usefulness of fibrin gel as a biological scaffold for intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells

Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Rodríguez A, Zurita M, Vaquero J

Unidad de Investigación en Neurociencias y Cátedra FUNDACIÓN MAPFRE-UAM para Investigación en Daño Cerebral. Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Analizar el efecto de células madre del estroma de médula ósea en los traumatismos cerebrales.

Material y Método: Se causó trauma cerebral por contusión, en 20 ratas Wistar adultas. A los 2 meses se transplantó CM adultas (3×10^6), como suspensión en suero fisiológico (volumen total de 30 μ L). En 10 animales se inyectó directamente sobre la zona de lesión traumática cerebral y en otros 10 animales sobre una malla de gel de fibrina insertada en la lesión. La evolución funcional de los animales se estudió mediante los tests de mNSS y Rota-rod.

Resultados: Todos los animales mostraron déficit funcional tras la lesión traumática, con mejoría significativa tras el trasplante intracerebral de CM, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos experimentales.

Conclusión: La inserción de una malla de fibrina en una lesión cerebral traumática, como soporte para la administración intralesional de CM no parece ser una técnica útil para optimizar los resultados funcionales obtenidos con este tipo de terapia celular.

Palabras clave:

Lesión cerebral traumática, terapia celular, gel de fibrina.

Abstract

Objective: To analyze the effect of intracerebral transplantation of adult stem cells obtained from bone marrow stroma in an experimental model of traumatic brain injury.

Material and Method: We performed a traumatic brain contusion in 20 adult Wistar rats. At 2 months of injury, 3×10^6 bone marrow stromal cells as saline suspension of CM, with a total volume of 30 μ L, was injected in the area of traumatic brain injury. In 10 animals the injection was made directly over the traumatic brain injury and in other 10 animals the injection was made on the mesh of fibrin gel. The functional evolution of animals was studied from injury to two months after transplantation using the mNSS test and the Rota-rod test.

Results: All animals showed a clear and significant functional deficits after traumatic injury, and experienced significant improvement after intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells, with no statistically significant differences between experimental groups.

Conclusion: The insertion of a mesh of fibrin in the area of brain injury, as support for intralesional administration of CM, in an experimental model of traumatic brain injury, does not seem to be a useful technique to optimize the functional results obtained with this type of therapy cell.

Key words:

Traumatic brain injury, cell therapy, fibrin glue.

Correspondencia

C. Bonilla Horcajo
Unidad Investigación Neurociencias.
Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda
Joaquín Rodrigo, 2. 28222-Majadahonda (Madrid)

Introducción

Diferentes estudios han demostrado que una matriz extracelular organizada es necesaria para lograr la adhesión, diferenciación y proliferación celular. En las estrategias de terapia celular para reparar lesiones en el Sistema Nervioso Central (SNC), las células a trasplantar generalmente se inyectan en un tejido lesionado en el que la vascularización es baja y donde aparece una respuesta inflamatoria. En estas circunstancias adversas, las células trasplantadas pueden morir por un proceso de apoptosis desencadenado por la pérdida de contacto intercelular, al que se conoce como «anoikis». Por esta razón, se ha planteado la necesidad de obtener una matriz de soporte que permita un entorno permisivo para la supervivencia, la proliferación y la diferenciación celular [1]. Entre las diversas matrices biológicas que se han considerado útiles como soporte celular está el gel de fibrina, ya que la malla que forma la proteína es lo suficientemente porosa para permitir la migración de las células y el contacto entre ellas [2].

El gel de fibrina se basa en la polimerización de fibrinógeno y trombina con calcio para formar una red de fibrina que imita los pasos finales de la coagulación de la sangre. Originalmente fue preparado con plasma de la sangre de donantes, sin embargo, debido a la baja concentración de fibrinógeno en plasma, la estabilidad y la calidad del gel de fibrina fueron bajos. Actualmente existen preparados comerciales, homologados para uso clínico como sellantes biológicos, y experimentalmente, diversos estudios han señalado que el gel de fibrina puede ser útil como soporte celular. Se ha descrito, además, que las matrices diseñadas con fibrina pueden aumentar la adhesión y la proliferación celular en presencia de factores tróficos [3][4], por lo que han sido utilizadas como soporte de células madre embrionarias [5], fibroblastos [6] o células madre estromales [7].

En estudios previos, se han obtenido evidencias de que la administración intracerebral de CM del estroma de médula ósea es capaz de recuperar parcialmente los déficit funcionales que tienen lugar tras un TCE importante en ratas adultas. En estos estudios, la administración de las CM parece ir seguida de la incorporación de estas células al tejido huésped, con signos de diferenciación neural, y de un aumento de la neurogénesis endógena (8). A pesar de ello, se admite que existe una importante pérdida de CM tras el trasplante, ya que éstas son colocadas en una zona donde hay una cavidad necrótica postraumática y donde es difícil lograr un efectivo contacto intercelular. Con la hipótesis de que la administración de CM sobre una matriz biológica de fibrina podría mejorar las condiciones de contacto intercelular y aumentar la eficacia de este tipo de terapia celular se diseñó el presente estudio experimental.

Material y Métodos

Se utilizaron 20 ratas Wistar hembras de 200-250 g de peso, que fueron anestesiadas con isoflurano y sometidas posteriormente a una craneotomía de 10 mm de diámetro sobre el parietal derecho, entre el lambda y el bregma. Tras la exposición de la duramadre cortical, se procedió a abrir una ventana sobre la misma con el fin de exponer la superficie cortical. A continuación se produjo una lesión cerebral traumática grave dejando caer, desde una altura de 15 cm, sobre la superficie del cerebro, una barra de 12 mm de sección y 25 g de peso. Esta barra fue guiada en su caída a través de un cilindro hueco, adaptado al área de la craneotomía y que permite realizar una lesión estandarizada que se define como el producto del peso de la barra por la altura desde la cual se deja ésta caer (Figura 1).

Técnica del trasplante celular

Se diseñaron dos grupos experimentales. En el grupo CM (n:10), se hizo un trasplante intracerebral de 3×10^6 CM resuspendidas en suero fisiológico, mientras que en el grupo CM/Matriz (n:10) se hizo un trasplante intracerebral de 3×10^6 CM inyectadas sobre la matriz de fibrina previamente preparada. Para ello, transcurridos dos meses después del TCE, todas las ratas fueron anestesiadas con isoflurane al 4% en N₂O:O₂ (70:30) y premedicadas con morfina (2.5 mg/kg, s.c.) y meloxicam (2 mg/kg, s.c.). La anestesia se mantuvo mediante isoflurane al 1-2% en N₂O:O₂ (70:30) y durante la cirugía las ratas respiraban espontáneamente. Se abrió una ventana sobre la misma zona donde se había realizado la craneotomía, con el fin de exponer la cavidad post-traumática. Una vez realizada la apertura del campo quirúrgico, los trasplantes se hicieron según el grupo experi-

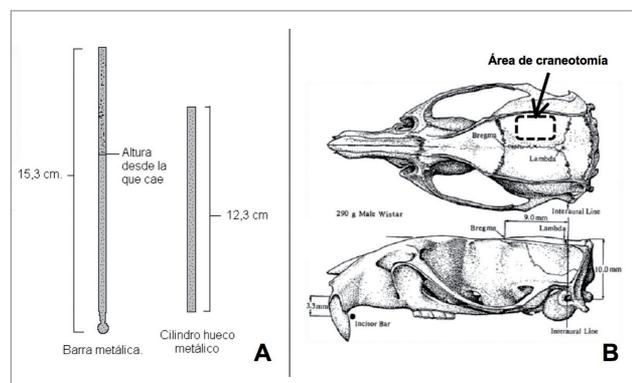


Fig. 1. Modelo experimental. A) Barra de acero para producir una lesión cerebral por contusión. B) Zona de craneotomía para provocar una lesión cerebral en la zona parietal derecha.

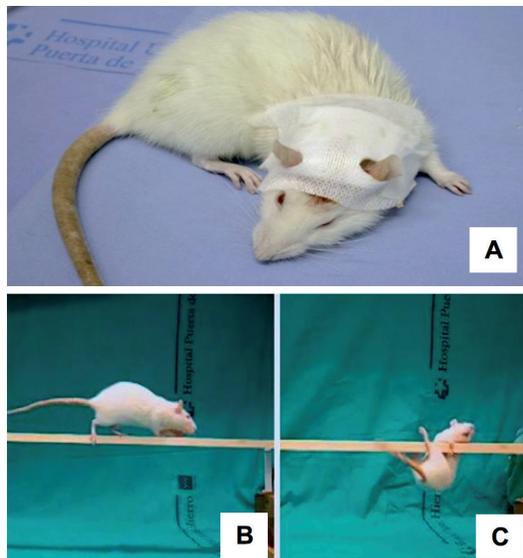


Fig. 2. A) Animal traumatizado con tendencia a girar hacia el lado de la lesión. B) Test de la viga, en un animal normal. C) Un animal con trauma cerebral previo tiene dificultad para desplazarse en línea recta por una viga.

mental correspondiente. Al grupo CM/Matriz se les trasplantó intralesionalmente la matriz de fibrina, preparada como se indica anteriormente, a través del sistema de inyección de doble jeringa. Transcurridos 10 minutos polimerizó el gel y se inyectaron 3×10^6 CM dentro de dicha matriz de soporte. En el grupo CM se administraron únicamente CM en suero fisiológico. Una vez cerrado el campo quirúrgico, las ratas fueron colocadas en una cámara con temperatura y humedad controladas y se realizaron cuidados postoperatorios acordes con su situación clínica.

Tras la cirugía, las ratas fueron colocadas en una cámara con temperatura y humedad controladas y se realizaron cuidados postoperatorios acordes con la situación clínica de las mismas y procedimientos diarios de vigilancia. En todos los animales experimentales se observaron daños característicos de un trauma cerebral inmediatamente tras el impacto, que pueden ser valorados con diferentes tests de valoración funcional (Figura 2). Con este modelo, los animales mostraron una disfunción cerebral significativa. Tras 2 meses de seguimiento sin modificación del déficit neurológico se consideró que éste era un déficit establecido y se procedió al tratamiento de terapia celular mediante el trasplante intracerebral, en la zona de lesión traumática, de CM adultas mesenquimales, obtenidas del estroma de médula ósea. Al objeto de estudiar la influencia de una matriz de fibrina como soporte celular de las CM, se hicieron dos grupos experimen-

tales, trasplantando CM en suero fisiológico (10 animales), o bien en una matriz de gel de fibrina (10 animales).

Obtención de CM del estroma de la médula ósea

Para la obtención de las CM se utilizaron ratas Wistar macho adultas de entre 200 y 250 g de peso. Tras sacrificar los animales con una mezcla de 70% CO_2 y 30% O_2 , se aislaron las tibias y los fémures, siendo inmediatamente colocados a 4°C en medio alfa-MEM (Cambrex) / 2,5% suero fetal bovino (FBS, Lonza) suplementado con antibiótico (Lonza). Tras cortar las epífisis de los huesos en condiciones estériles, bajo campana de flujo laminar, la médula ósea fue extraída mediante lavado de los huesos con una jeringuilla y una aguja n° 26, cargada con 2mL de medio alfa-MEM completo, es decir, suplementado con 2mM de L-glutamina (Lonza), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomicina, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina y con 20% FBS. Posteriormente, las células de la médula ósea fueron disgregadas mediante pipeteado y luego filtradas a través de una malla de nylon de 70 μm . La suspensión celular resultante fue sometida a recuento en cámara de Neubauer mediante el test de viabilidad del azul tripán. Tras el recuento, las células madre fueron subcultivadas en frascos de 75 cm^2 en una concentración 160.000 células/ cm^2 en presencia de 12mL de medio alfa-MEM completo/20%FBS, en una estufa a 37°C , con 5% CO_2 . A las 72 horas de incubación el sobrenadante fue retirado y sustituido por medio nuevo. Cuando las células alcanzaron un desarrollo cercano a la confluencia, fueron levantadas del frasco de cultivo mediante su incubación con 3 mL de tripsina, 0.25%/1mM EDTA (Lonza), durante 4-5 minutos, a 37°C . Tras este periodo de incubación, la tripsina fue inactivada con 6 mL de medio alfa-MEM completo/2,5% FBS. Las células obtenidas, tras ser centrifugadas, a 1200 rpm, durante 15 minutos, fueron lavadas al menos dos veces con medio alfa-MEM completo/2,5%FBS mediante centrifugación, a 1000 rpm, durante 5 minutos cada lavado. Finalmente el botón celular obtenido fue diluido en medio alfa-MEM completo/10%FBS y sometido a recuento nuevamente mediante el test de viabilidad de azul tripán. Tras el recuento, las células madre fueron subcultivadas en frascos de 75 cm^2 en una concentración 15.000 células/ cm^2 en presencia de 12mL de medio alfa-MEM completo/10% FBS.

Preparación de las CM para el trasplante intracerebral

Para obtener el material donante para el trasplante celular, las células correspondientes a un primer pase (P1) fueron levantados en condiciones estériles y bajo campana de flujo laminar por digestión enzimática con tripsina



0.25%/1mM EDTA durante 4-5 minutos, a 37°C. Tras este periodo de incubación la tripsina fue inactivada con 6 mL de medio alfa-MEM completo/2,5% FBS. Las células obtenidas tras ser centrifugadas, a 1200 rpm, durante 15 minutos, fueron lavadas con suero fisiológico y sometidas a recuento celular mediante el test de viabilidad del azul tripán. Una vez realizado el recuento, 3×10^6 CM fueron nuevamente centrifugadas a 1000 rpm, durante 5 minutos. Finalmente, el botón celular obtenido fue diluido en suero fisiológico al volumen requerido para el trasplante, aproximadamente 30 μ L y cargadas en una jeringuilla Hamilton de 50 μ L, en condiciones estériles y bajo campana de flujo laminar. El procesamiento de las CM para realizar el trasplante junto con la matriz de fibrina se desarrolló de la misma forma, con la diferencia de que las CM (3×10^6) se inyectaron sobre la matriz de fibrina previamente implantada en la cavidad postraumática.

Preparación de la matriz de fibrina

Las matrices en forma de gel de fibrina se prepararon utilizando un kit de Tissucol® Duo 5 mL (Baxter, SL, Valencia, España), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El gel se forma por la mezcla de dos soluciones separadas de un componente A, compuesto por fibrinógeno 10 mg/mL, fibronectina 5.5 mg/mL, factor XIII 30 U/mL, plasminógeno 0.8 mg/mL y aprotinina 3000 UI/mL. El llamado componente B lo componían trombina 4 UI/mL y cloruro cálcico 20 μ mol/mL.

Cada uno de los componentes se cargó en una jeringuilla de 2 mL, las cuales fueron colocadas sobre un sistema de inyección de doble jeringa que hace que los dos componentes se mezclen en el mismo momento, para formar la matriz que dará soporte posteriormente a las CM. Una vez colocados los dos componentes sobre la cavidad se estimó un tiempo de 10 minutos hasta que polimerizó.

Tests de valoración funcional

La evaluación neurológica se realizó a través de los tests funcionales mNSS (modified Neurological Severity Score test) y Rota-rod. El test mNSS cuenta con una serie de valoraciones que abarca la función motora, sensorial, test de equilibrio sobre una viga y valoración de la presencia o no de determinadas respuestas reflejas (9-12). Este test tiene una puntuación máxima de 19 puntos, estableciéndose una serie de categorías de gravedad según la puntuación obtenida: 1 a 6 puntos, lesión leve; 7 a 12 puntos, lesión moderada, y 13 a 19 puntos, lesión severa. El test del Rota-rod mide fundamentalmente coordinación y equilibrio, siendo un método clásico para medir el grado de lesión en animales

de experimentación sometidos a TCE. Consiste en un rodillo sobre el que se coloca el animal y que se acelera progresivamente durante un minuto. Los animales con lesiones cerebrales obtienen menos puntuación que los animales sanos, y la puntuación irá aumentando según sea más leve el grado de lesión [13].

Estudios histológicos

Al final del estudio, tras sacrificar los animales, se estudiaron, en 3 de cada grupo, los aspectos macroscópicos e histológicos de la zona cerebral donde se había hecho el trasplante. La técnica histológica utilizada fue la de hematoxilina-eosina.

Análisis estadístico

Los datos de valoración funcional obtenidos se analizaron estadísticamente para detectar las posibles diferencias en la función neurológica. Se realizaron dos tipos de análisis estadísticos utilizando el soporte informático SPSS (versión 15.0): a) t de Student para la comparación de medias de muestras relacionadas, para detectar las diferencias antes y después del TCE y b) t de Student para la comparación de muestras independientes, considerándose significación estadística una $p < 0.05$. Se analizaron los grupos de datos correspondientes a los dos tratamientos, por un lado el grupo tratado con CM en suero fisiológico (n: 10) y por otro, el grupo tratado con CM en matriz de fibrina (n: 10), en la semana 2, 4, 6 y 8 post-trasplante.

Resultados

Tras el TCE se detectó un déficit funcional evidente en todos los animales, sin que se observara modificación significativa del déficit neurológico en el transcurso de los meses siguientes a la lesión. Tras el trasplante de CM se objetivó en ambos grupos una mejoría significativa de la función neurológica respecto de la situación basal, que tiende a estabilizarse en las siguientes semanas de evolución. Sin embargo, comparando ambos grupos experimentales, se observó que el grupo de animales que recibió un trasplante de CM en suero mostraba una mejoría neurológica discretamente superior a la que se observó en el grupo de animales que recibieron CM soportadas sobre matriz de fibrina, sin que esta diferencia llegara a ser estadísticamente significativa ($p > 0.05$) a lo largo del seguimiento post-trasplante (Figura 3) (Figura 4). Desde el punto de vista morfológico, al término del seguimiento de los animales no se observaron diferencias macroscópicas o histológicas en los animales correspondientes a ambos grupos experimentales (Figura 5).

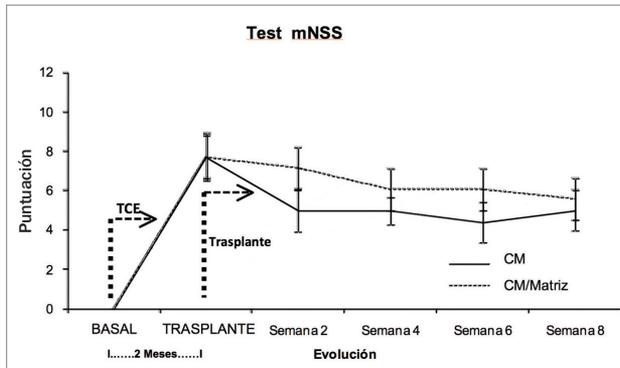


Fig. 3. Evolución funcional de ambos grupos experimentales, de acuerdo con el test mNSS. Se observa un claro déficit tras el traumatismo y mejoría significativa ($p < 0,05$) tras el trasplante. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos experimentales tras el trasplante intracerebral de CM.

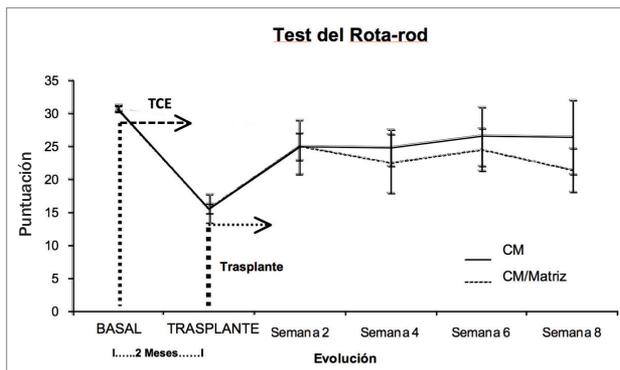


Fig. 4. Perfil temporal de la recuperación funcional a través del test del Rota-rod, de ambos grupos experimentales. Se observa un claro déficit tras el traumatismo y mejoría significativa ($p < 0,05$) tras el trasplante. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p > 0,05$) en ningún punto del estudio tras el trasplante.

Discusión

Nuestro estudio confirma las observaciones previamente publicadas acerca de la utilidad de la terapia celular con CM estromales de médula ósea para disminuir las secuelas neurológicas que se producen en modelos experimentales de daño cerebral traumático [8-12]. Sin embargo, no hemos podido demostrar que el trasplante de CM sobre una matriz de fibrina aumente los buenos resultados que se obtienen tras la administración de CM suspendidas en suero fisiológico. Desde el punto de vista morfológico, nuestros hallazgos tampoco demuestran cambios significativos en el tejido cerebral cuando se compara el grupo de animales que

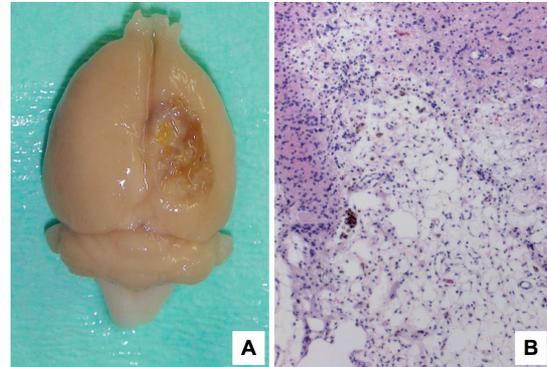


Fig. 5. Aspectos macroscópico (A) y microscópico (B) de la zona de lesión traumática, similar en ambos grupos experimentales, al finalizar el estudio.

recibieron CM sin matriz o con matriz de fibrina. En el presente estudio, y de acuerdo con los objetivos planteados, no se consideró necesario tratar de identificar la supervivencia o diferenciación de las células trasplantadas, puesto que en estudios previos se ha constatado tanto la supervivencia a largo plazo de las CM trasplantadas localmente tras una lesión cerebral traumática, como su capacidad para diferenciarse a elementos neurales y para inducir neurogénesis endógena [8].

Analizando estos hechos, nuestros resultados sugieren la ineficacia del gel de fibrina, al menos utilizando el preparado comercial descrito en este estudio, para incrementar el efecto beneficioso que se obtiene tras la administración intracerebral de CM en un modelo experimental de lesión cerebral traumática. Existen estudios que señalan la utilidad del gel de fibrina como matriz biológica de soporte para protocolos de terapia celular dentro del ámbito de la traumatología y de la cirugía maxilofacial (7) aunque no se ha verificado, en dichos estudios, la ventaja que realmente aporta esta matriz. Nuestro estudio sugiere que en el SNC, una matriz biológica de fibrina no aporta ventajas significativas en protocolos de terapia celular que utilizan CM estromales, lo que puede obedecer a que en las condiciones experimentales utilizadas, el gel de fibrina no tiene las características óptimas para permitir mayores índices de supervivencia y diferenciación neural respecto del trasplante de las CM en ausencia de esta matriz. Consecuentemente, se hacen necesarios estudios *in vitro* con el objetivo de valorar la supervivencia, proliferación y diferenciación neural de las CM estromales de médula ósea. La manipulación de los componentes del gel de fibrina, al objeto de variar la consistencia de la malla de fibrina, es una de las



posibilidades a investigar y que pueden permitir la obtención de matrices biológicas útiles para optimizar los resultados de la terapia celular aplicada a lesiones traumáticas cerebrales. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tabata Y. Important contribution and necessity of stem cells scaffolds for regenerative medicine and therapeutic applications. *Nippon Rinsho* 2008; 66:881-6.
2. Laurens N, Koolwijk P, De Maat MP. Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost* 2006; 4:932-9.
3. Ruzzymah BH. Autologous human fibrin as the biomaterial for tissue engineering. *Med J Malaysia* 2004; 59(suppl B):30-1.
4. Schmoekel HG, Weber FE, Schense JC, Grätz KW, Schawaller P, Hubbell JA. Bone repair with a form of BMP-2 engineered for incorporation into fibrin cell ingrowth matrices. *Biotechnol Bioeng* 2005; 89:253-62.
5. Willerth SM, Arendas KJ, Gottlieb DI, Sakiyama-Elbert SE. Optimization of fibrin scaffolds for differentiation of murine embryonic stem cells into neural lineage cells. *Biomaterials* 2006; 27:5990-6003.
6. Cox S, Cole M, Tawil B. Behavior of human dermal fibroblasts in three dimensional fibrin clots: dependence on fibrinogen and thrombin concentration. *Tissue Eng* 2004; 10:942-54.
7. Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, Ueda M. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg* 2003; 31:27-33.
8. Bonilla C, Zurita M, Otero L, Aguayo C, Vaquero J. Delayed intralésional transplantation of bone marrow stromal cells increases endogenous neurogenesis and promotes functional recovery after severe traumatic brain injury. *Brain Inj* 2009; 23:760-9.
9. Mahmood A, Lu D, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. *Neurosurg* 2001; 49:1196-203.
10. Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurg* 2003; 53:697-702.
11. Mahmood A, Lu D, Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2004; 21:33-9.
12. Qu C, Xiong Y, Mahmood A, Kaplan DL, Goussev A, Ning R, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in mice with bone marrow stromal cell-impregnated collagen scaffolds. *J Neurosurg* 2009; 111:658-65.
13. Hofstetter C P, Schwartz E J, Hess D, Widnalk J, El Manira A, Prockop DJ, Olson L. Marrow stromal cells from guiding strans in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 2002; 99:2199-204.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este trabajo. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.