



ORIGINAL

Terapia celular para el tratamiento del daño cerebral traumático: Utilidad de diferentes escalas de valoración funcional

Cell therapy for treatment of traumatic brain injury: Utility of different tests for functional assessment

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: En el presente estudio evaluamos la utilidad de una serie de tests para cuantificar el déficit postraumático en un modelo de contusión cerebral experimental y su sensibilidad para detectar la recuperación funcional tras el uso de protocolos de terapia celular con células madre (CM) adultas.

Material y Método: Los tests de valoración usados fueron Rota-rod, mNSS, y Smart. Ratas Wistar adultas (n: 20) fueron valoradas 3 días antes del TCE por contusión, con un seguimiento posterior de 2 meses tras los que a 10 animales se administró intracerebralmente 3×10^6 CM adultas, obtenidas del estroma de médula ósea, en suero fisiológico, en un volumen total aproximado de 30 μ L; otros 10 animales recibieron el mismo volumen sin CM. Se siguió durante dos meses la posible recuperación motora y sensitiva producida tras el tratamiento.

Resultados: Los tests de valoración utilizados son válidos para discernir entre animales lesionados y animales sanos. Por otra parte, el tratamiento local con CM mejora los déficits motores y sensitivos producidos por la lesión traumática cerebral.

Conclusión: La terapia celular con CM adultas es útil para obtener recuperación de las secuelas producidas por la lesión cerebral traumática.

Palabras clave:

Lesión cerebral traumática, terapia celular, valoración funcional.

Abstract

Objetivos: This study evaluated the sensitivity of a series of tests to quantify the functional deficits in a model of experimental brain contusion and its usefulness for detecting functional recovery after cell therapy with adult stem cells.

Methods: The tests used in this study were the Rota-rod test, the test of neurological impairment assessment (also known as mNSS), and finally the Smart software, that analyzes changes in the behavior of animals. Adult Wistar rats (N: 20) were assessed 3 days before traumatic brain injury (TBI) and for 2 months after injury. After this time, 3×10^6 adult stem cells, obtained from bone marrow stroma, suspended in saline, with a total volume of approximately 30 μ L (n: 10), or the same volume of saline without stem cells (n: 10), were intracerebrally administered. The rats were followed for two months.

Results: We obtained functional improvement after adult stem cells administration. On the other hand, the tests used in this study distinguish between injured and healthy animals.

Conclusions: Cell therapy using adult stromal cells is useful for functional improvement after TBI.

Key words:

Traumatic brain injury, cell therapy, functional assessment.

Correspondencia

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



Introducción

El traumatismo craneoencefálico (TCE) presenta una incidencia anual en los países industrializados de entre 200 y 300 casos por cada 100.000 habitantes. De estos, un 10-20% sufrirán un TCE grave. Los pacientes que sobreviven a la lesión cerebral pueden sufrir pérdidas en su función motora y sensorial, sin que exista ningún tratamiento efectivo para tratar las secuelas funcionales del daño traumático cerebral, exceptuando los logros parciales que pueden obtenerse por medio de la rehabilitación. Todo ello ha llevado a intentar comprender experimentalmente los mecanismos que se desencadenan tras una lesión traumática cerebral, al objeto de poder cuantificar las secuelas del TCE y valorar el resultado de posibles medidas terapéuticas. El desarrollo de modelos animales que reproducen los cambios patológicos que se desarrollan respecto al TCE humano nos ayudan a comprender los mecanismos que suceden en esta patología. Aunque todos estos ensayos resultan muy prometedores, aún no se han conseguido desarrollar terapias neuroprotectoras lo suficientemente potentes para detener el daño evolutivo que se produce en las primeras fases tras un TCE [1].

Un objetivo de la investigación experimental del TCE es poder relacionar los cambios moleculares y anatómicos desencadenados por la lesión, con los cambios en el comportamiento y en la función motora y sensorial de los animales lesionados. Para intentar comprender la evolución que sigue a una lesión cerebral, se han desarrollado multitud de modelos experimentales de TCE, entre los que se encuentra el modelo de lesión cerebral por contusión [2] que causa déficits neurológicos unilaterales en los animales, los cuales son visibles desde los primeros momentos.

En la actualidad existen multitud de escalas de valoración de las funciones neurológicas, cada uno de los cuales se encuentra destinado a medir unas características concretas de la lesión cerebral. Estas escalas han sido utilizadas en estudios de recuperación de la función tras sufrir un daño en regiones del Sistema Nervioso Central (SNC) que controlan la respuesta sensorial y motora, y también para seguir la evolución de diferentes terapias desarrolladas sobre estos modelos de lesión cerebral. Entre ellos se encuentra el Neurological Severity Score (NSS) test y sus modificaciones (mNSS). El mNSS es una escala que consta de diferentes puntos que miden la respuesta motora y sensorial [3]. Centrado fundamentalmente en la respuesta motora se encuentra el Rota-rod, una prueba que mide la coordinación y el equilibrio [4]. Clásicamente se utiliza para valorar la respuesta motora y sensorial en modelos de hemorragia intracerebral y

traumatismo cerebral sobre roedores. El Morris Water Maze (MWM) test mide la función cognitiva en modelos experimentales [5][6] y ofrece una valoración muy fina del comportamiento de los animales, pero su desarrollo requiere un soporte técnico muy complejo. Una versión ligeramente más sencilla es la que nos ofrece el Smart, donde se miden aspectos cognitivos de los animales, grabando imágenes en video.

Por otra parte, un aspecto a tener en cuenta es la sensibilidad que ofrecen las distintas escalas para valorar, sobre los diferentes modelos experimentales, la eficacia de nuevas terapias. Actualmente, el desarrollo de terapias celulares con células madre (CM) adultas ha cobrado un creciente interés para el tratamiento de diversas enfermedades, y en el campo concreto de las lesiones traumáticas del SNC, parece abrir perspectivas antes insospechadas. Cabe destacar que en los últimos años se han llevado a cabo algunos estudios sobre el efecto terapéutico de las CM adultas procedentes de la médula ósea, para tratar las secuelas de un TCE [7]. Existen numerosas evidencias experimentales que apoyan la idea de que las CM adultas poseen la capacidad de generar distintos tipos celulares especializados [8], diferentes al de su origen embrionario, e incluso son capaces de diferenciarse hacia elementos del SNC [9][10-13]. Estudios realizados recientemente demuestran que las CM, tras ser trasplantadas en el parénquima lesionado, se diferencian a células nerviosas, integrándose en el tejido y asociándose a signos de recuperación funcional [14-17]. A pesar de ello, antes de plantear los parámetros con los cuáles estas nuevas técnicas podrán ser aplicadas en clínica humana existen aún cuestiones que deben ser resueltas en el animal de experimentación, al objeto de optimizar los parámetros de evaluación funcional. Uno de los problemas a resolver es la capacidad de detectar los cambios funcionales, tanto sensoriales como motores, de los diferentes escalas de valoración. Estas pruebas deben ser fiables para detectar los cambios funcionales tras un TCE y deben ser útiles para detectar pequeños cambios sensoriales y motores tras la administración de tratamientos experimentales.

El objetivo del presente trabajo es comparar tres escalas de valoración que son normalmente utilizados en estudios de daño cerebral, el Rota-rod, el mNSS y el Smart, intentando profundizar en los aspectos que valoran dichas pruebas, y al mismo tiempo, valorar tanto la utilidad de usarlos juntos o por separado para estudiar las secuelas de una lesión cerebral traumática en la rata adulta, como sus posibles modificaciones tras la administración intracerebral de CM adultas, obtenidas del estroma de médula ósea.



I Material y Métodos

Utilizamos 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 hueso parietal derecho del cráneo, entre las suturas lambda y bregma. Tras la exposición de la duramadre, se procedió a abrir una ventana sobre la misma, con el fin de exponer la superficie cerebral. Se produjo una lesión cerebral traumática dejando caer, desde una altura de 15 cm, sobre la superficie del cerebro, una barra de 12 mm de diámetro y 25 g de peso. Esta barra fue guiada en su caída a través de un cilindro hueco, adaptado al área de la craneotomía, lo 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. Con este modelo experimental, logramos producir una lesión cerebral grave. Tras la cirugía, las ratas fueron colocadas en una cámara con temperatura y humedad controladas, realizándose cuidados postoperatorios acordes con la situación clínica de las mismas y procedimientos diarios de vigilancia. En todos los animales se observaron signos característicos de un daño cerebral inmediatamente tras el impacto traumático y no mostraron recuperación funcional espontánea después de dos meses, momento en que se llevó a cabo el presente estudio.

Grupos experimentales

Para poder comprobar la posible utilidad del trasplante de CM en el tratamiento del daño cerebral crónico se hicieron los siguientes grupos experimentales: Grupo A (n:10), trasplante intralesional de las CM resuspendidas en suero fisiológico (TCE+CM). Grupo B (n:10), trasplante intralesional simplemente de suero fisiológico (TCE+Sero).

Transcurridos dos meses tras el TCE todas las ratas fueron anestesiadas con isoflurano al 4% en N₂O:O₂ (70:30) y premedicadas con morfina (2.5 mg/kg, s.c.) y meloxicam (2 mg/kg, sc). La anestesia se mantuvo mediante isoflurano al 1-2% en N₂O:O₂ (70:30) y durante la cirugía las ratas respiraban espontáneamente. Se procedió a abrir una ventana sobre la misma zona donde dos meses antes 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 realizaron según el grupo experimental correspondiente. A 10 ratas hembras Wistar adultas se les trasplantaron intralesionalmente 3x10⁶ CM, y otras diez ratas recibieron una inyección intralesional de 30 µL de suero fisiológico (controles). 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, así como procedimientos diarios de vigilancia.

Para llevar a cabo el seguimiento de la función motora y sensorial se realizaron tres pruebas diferentes, con el fin de detectar los posibles cambios en la función neurológica, mNSS: escala de valoración sensitivo-motora; Rota-rod: prueba de coordinación motora (equilibrio y coordinación) y Smart, obteniendo la distancia recorrida, el tiempo de permanencia y el número de entradas en cada zona.

Todos las pruebas se realizaron tres veces antes del TCE (una vez al día, 3 días antes del TCE), con el fin de establecer los valores basales de los animales. Posteriormente se fue realizando un seguimiento semanal durante los 2 meses que siguieron al desarrollo de la lesión cerebral. El trasplante se realizó transcurridos esos 2 primeros meses, y a partir de ese momento se volvió a realizar un seguimiento semanal, hasta 4 meses tras el TCE (2 meses tras el trasplante o el tratamiento control).

Se establecieron dos tipos de estudios, medimos la eficacia de las diferentes pruebas para detectar la lesión cerebral: se toman los datos de los animales (n: 20), antes y después del TCE que se analizaron estadísticamente y obtuvimos la sensibilidad de las pruebas para detectar los cambios neurológicos que se producen como consecuencia de la administración de las CM. Se tomaron los datos de la evolución de los animales tratados con CM (n:10) y de los animales controles (n:10) semanalmente y se analizó la capacidad de detectar los cambios entre los dos grupos.

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% CO₂ y 30% O₂, se aislaron las tibias y los fémures, siendo inmediatamente colocados 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 2cc de medio alfa-MEM completo, es decir, suplementado con 2mM de L-glutamina (Lonza), 100u/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina, 5 µg/ml de gentamicina (Lonza) y sin deoxi-ribonucleótidos ni ribonucleótidos 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 micras. 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



cm² en una concentración 160.000 células/cm² en presencia de 12 cc de medio alfa-MEM completo/20%FBS, en una estufa a 37°C con 5% CO₂. 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, éstas 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 cm², en una concentración 15.000 células/cm² en presencia de 12mL de medio alfa-MEM completo / 10% FBS.

Preparación de los trasplantes celulares

Para obtener el material donante para el trasplante celular, células correspondientes a un primer pase (P1) fueron levantadas en condiciones estériles, 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, 3x10⁶ 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 µL y las células fueron cargadas en una jeringuilla Hamilton de 50 µL, en condiciones estériles y bajo campana de flujo laminar.

Escala de valoración sensitivo-motora

La evaluación neurológica se realizó a través de la prueba mNSS [3][18-20] que cuenta con una serie de valoraciones que abarca la función motora, sensorial, test de equilibrio de la viga (Tabla 1) y medida de ausencia de reflejos. Consta de una puntuación máxima de 19 puntos, con las diferentes categorías según la puntuación obtenida:

- 1 a 6 puntos, lesión leve.
- 7 a 12 puntos, lesión moderada.
- 13 a 19 puntos, lesión severa.

Prueba del Rota-rod

La coordinación y el equilibrio fue medida con el Rota-rod, un método clásico de medir el grado de lesión en animales de experimentación sometidos a TCE. El Rota-rod consta de un rodillo sobre el que se coloca el animal que acelera progresivamente de 4 a 40 cm²/s 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 [4].

Smart

La distancia recorrida, el tiempo de permanencia y el número de entradas en cada zona del campo donde se encuentran los animales se midieron a partir del programa informático Smart. Dicho programa analiza las imágenes que se recogen a través de una cámara que graba el interior de un cubil de 35x45 cm cerrado, donde se introdujeron a los animales de experimentación. Se determinaron una serie de parámetros para estandarizar las medidas. Se tomaron los valores durante 1,5 minutos y la velocidad máxima se estableció a los 10 cm/s.

Se definieron una serie de áreas con el fin de establecer las diferencias en el movimiento y la orientación, las cuales se agruparon en dos zonas principales, zona interior y zona exterior del campo donde se encontraban. Los animales sanos se movían preferentemente por la zona exterior, mientras que los animales lesionados lo hacían indistintamente por ambas zonas.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos con las diferentes escalas de valoración se analizaron estadísticamente. 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 (n: 20), para detectar las diferencias antes y después del TCE y b) t de Student para la comparación de muestras independientes. Se analizaron los grupos de datos correspondientes a los dos tratamientos, por un lado el grupo tratado con suero (n: 10) y por otro, el grupo tratado con CM (n: 10), en los semana 2, 4, 6 y 8 post-trasplante, con el fin de poder detectar los efectos que se producen como consecuencia del mismo.

Resultados

Tras el TCE se detectó un déficit evidente en todos los animales. Se obtuvieron resultados de los tres métodos de valoración que se realizaron durante el transcurso de 4 meses desde la lesión cerebral, donde se observó una mejora significativa de la función neurológica en los animales trasplantados con CM respecto de los animales tratados sólo con



Tabla 1. Escala de valoración sensitivo motora generada

	Test sensorial y motor	Puntos
Prueba motora	Levantando la rata por el rabo	
	▮ Flexión de los miembros traseros	1
	▮ Flexión de los miembros delanteros	1
	▮ El animal está rotado	1
	Situando la rata en el suelo	
	▮ Camina normal	0
	▮ Inhabilidad para caminar recto	1
	▮ Circular hacia el lado parético (derecho)	2
	<hr/>	
Prueba sensorial	Test de orientación (visual y táctil)	1
	Test propioceptivo (sensibilidad profunda)	1
<hr/>		
Equilibrio en la viga	Mantiene el equilibrio con postura firme	0
	Se agarra al costado de la viga	1
	Abrazado a la viga y 1 de los miembros cae de la viga	2
	Abrazado a la viga y 2 de los miembros caen de la viga, o gira en la viga (> 60 seg)	3
	Consigue el equilibrio en la viga pero cae fuera (> 40 seg)	4
	Consigue el equilibrio en la viga pero cae fuera (> 20 seg)	5
	Cae fuera, no consigue el equilibrio o queda colgado de la viga (< 20 seg)	6
<hr/>		
Ausencia de reflejos	Reflejo «pinna» (sacudida de cabeza cuando tocamos conducto auditivo)	1
	Reflejo corneal (parpadeo del ojo cuando lo rozamos con un algodón)	1
	Reflejo «susto» (respuesta motora cuando hacemos ruido con las palmas de las manos)	1
	Inmovilidad y mirada fija	1
	Temblor (Sacudida de «perro mojado»)	1
	Irritabilidad, crisis epilépticas, clonus y miodistonia (espasticidad)	1
<hr/>		
	Puntuación máxima	19

Tabla 2. Tabla que muestra los valores obtenidos con el Smart antes y después de realizar el TCE (n: 20)

	Zona exterior		Zona interior	
	Antes TCE	Después TCE	Antes TCE	Después TCE
Número de entradas	1,33 ± 0,34	2,37 ± 0,28	1,05 ± 0,33	2,02 ± 0,32
Distancia recorrida (cm)	445,11 ± 33,04	378,57 ± 29,12	15,36 ± 4,73	29,21 ± 4,21
Tiempo de permanencia (seg)	88,78 ± 0,38*	85,51 ± 1,52	1,07 ± 0,39	4,40 ± 1,53

En todos los casos se obtuvieron diferencias significativas estadísticamente ($p < 0,05$), salvo en *, donde $p = 0,052$

suero. Al realizar el mNSS y el Rota-rod se detectaron diferencias evidentes en el comportamiento de los animales antes y después de la lesión, las cuales fueron significativas estadísticamente ($p < 0,05$). En las imágenes captadas a través del Smart, se detectaron diferencias significativas en el número de movimientos (número de entradas) que realizó el animal dentro del cubil, lo cual da idea de las dificultades de orientación y movimiento de los animales lesionados. Las diferencias en

el movimiento dentro del cubil se relacionaron con la distancia que recorría y el tiempo que pasaban dentro de las dos zonas definidas antes y después de la lesión. En los tres parámetros que midió el Smart (número de entradas, tiempo de permanencia y distancia recorrida, en la zona exterior y en la interior) se detectaron diferencias significativas (Tabla 2), salvo en el tiempo que permanecen los animales en la zona exterior, donde se obtuvo una $p = 0,052$.



Escala de valoración sensitivo-motora

Al realizar la escala de valoración sensitivo-motora (Figura 1) se observó una mejoría continua y progresiva de los animales trasplantados con CM respecto de los controles, dicha recuperación fue a partir de la semana 6, manteniéndose en la semana 8 tras el trasplante ($p < 0,05$).

Rota-rod

El Rota-rod mide la coordinación y el equilibrio de los animales, los cuales estaban disminuidos tras el daño cerebral. Al realizar el trasplante de CM se detectó una mejoría progresiva en la función motora respecto del grupo control (Figura 2), la cual fue significativa en todos los puntos del modelo, comenzando en la semana 2 tras el tratamiento ($p < 0,05$).

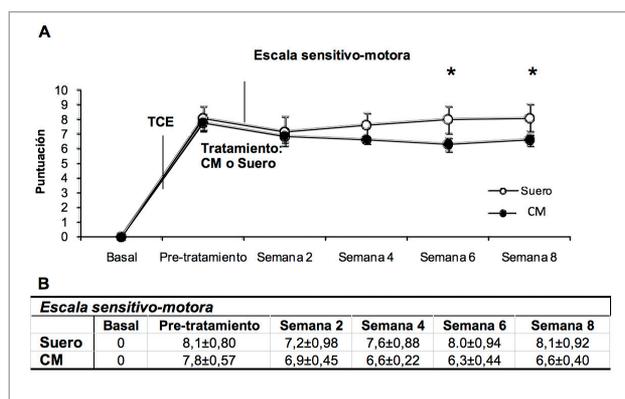


Fig. 1. A: Perfil temporal de la recuperación funcional a través de la escala sensitivo-motora del grupo tratado (CM) respecto del grupo control (Suero). B: Evolución de la escala sensitivo-motora.

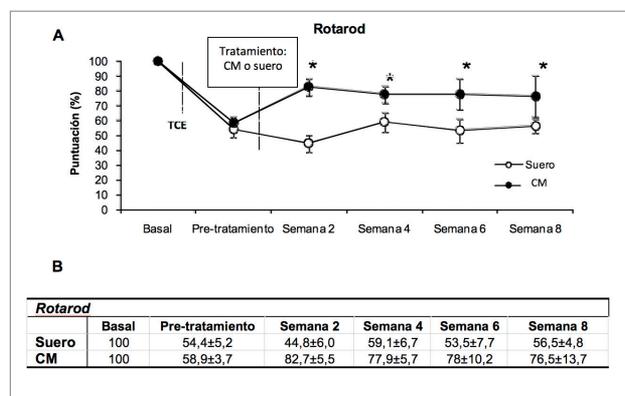


Fig. 2. A: Perfil temporal de la recuperación funcional a través de las medidas tomadas con el Rota-rod del grupo tratado (CM) respecto del grupo control (Suero). B: Evolución de las medidas del Rota-rod.

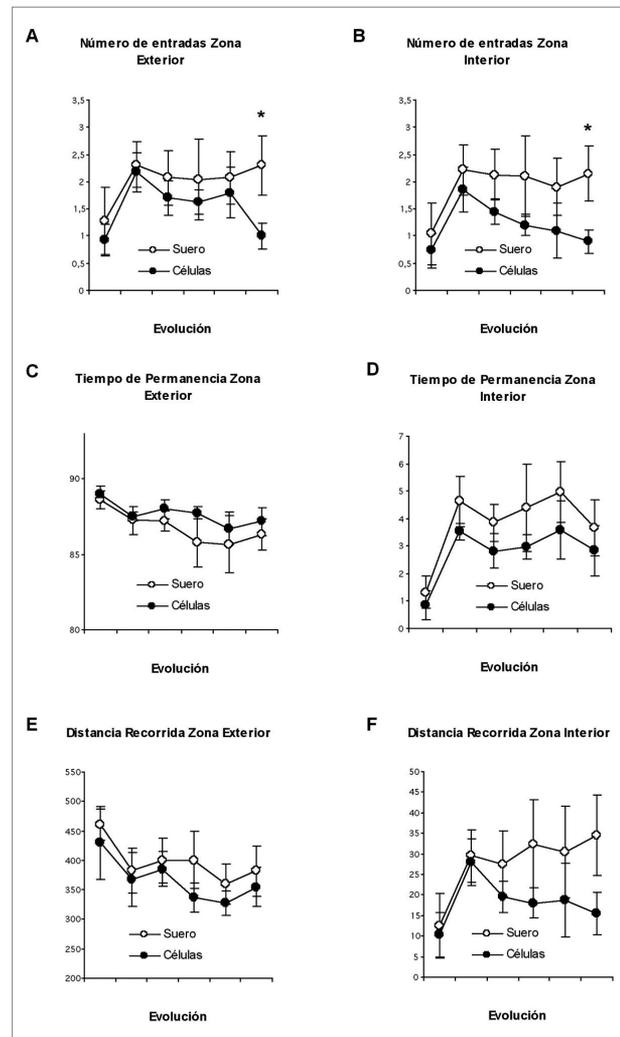


Fig. 3. Resultados obtenidos con el Smart, A) número de entradas tanto en la zona exterior como B) en la zona interior, C) el tiempo de permanencia en la zona exterior como D) en la interior y E) la distancia recorrida en la zona exterior como F) en la interior.

Smart

El Smart analizó las imágenes de video, donde detectaron diferencias en el comportamiento (número de entradas en cada zona) de los animales dentro del cubil en la semana 8, siendo significativa la diferencia en el número de veces que los animales se movieron por el cubil entre el grupo trasplante y el grupo control. No se detectaron diferencias significativas en el tiempo que pasaron los animales del grupo control dentro de la zona interior o exterior respecto de los animales trasplantados, así como tampoco en la distancia que recorrieron en ambas zonas (Figura 3).



I Discusión

El modelo de TCE desarrollado en el presente trabajo causa pérdida de tejido cerebral y deficiencias motoras graves que son evidentes en todos los animales inmediatamente después de sufrir el trauma. Para tratar de medir los cambios funcionales, se ponen a punto una serie de escalas de valoración, donde podemos ver que la terapia con CM tiene unos efectos beneficiosos dentro de los 2 meses en los que se sigue la evolución de los animales. El grupo experimental al que se le administró intracerebralmente suero fisiológico no presentó mejorías motoras al realizar ninguno de las diferentes pruebas de valoración, mientras que los animales a los que se les trasplantó localmente CM presentaron una evidente y progresiva recuperación en la función neurológica, comenzando a las pocas semanas después del tratamiento, lo cual sugiere la utilidad de este tipo de terapia para tratar las secuelas producidas como consecuencia de un TCE. Dichas observaciones se correlacionan con resultados descritos previamente por algunos autores en los que la administración de CM adulta, del estroma de la médula ósea, en fases tempranas tras producirse un TCE, disminuye los déficits funcionales tras una lesión traumática cerebral [21-24]. Cabría preguntarse si este efecto se continúa en el tiempo, haciéndose necesario el estudio de estos protocolos en periodos más largos. Prácticamente no hay evidencias de la capacidad beneficiosa de las células madre en fases más avanzadas de la lesión cerebral. En un estudio [25] se trasplantaron CM de la médula ósea por vía intravenosa en animales a los que se les había producido un mes antes una isquemia cerebral por oclusión de la arteria cerebral media. Se siguió la evolución de los animales durante 12 semanas, observándose mejorías sensoriales y motoras estadísticamente significativas al realizar el mNSS.

Las distintas pruebas valoran aspectos diferentes de la función neurológica. El Rota-rod, mide aspectos relacionados con la respuesta motora, muy relacionados con el equilibrio y la coordinación de la marcha de los animales [26]. El Rota-rod es un test ampliamente usado en experimentación animal para medir el grado de lesión cerebral [27]. Con el desarrollo del modelo de lesión cerebral crónico podemos observar que la respuesta motora en los animales es la primera que se ve influida por el trasplante de CM, donde la respuesta de los animales trasplantados con CM se ve muy favorecida desde la segunda semana respecto de los controles en lo que respecta al Rota-rod. Esta mejoría temprana en la respuesta motora medida con el Rota-rod, tiene su reflejo en la literatura, donde se ve ya una mejoría en animales trasplantados con células madre neurales humanas tan solo 10 días después de sufrir una hemorragia intracerebral y un tra-

tamiento del mismo [28] o transcurridos 15 días del trasplante de CM en un TCE o una isquemia cerebral en fase aguda [20][29]. La respuesta motora y sensorial, medida a través del mNSS, también parece mejorar en las fases tempranas tras realizar el tratamiento con CM, posiblemente porque un gran componente de esta escala se basa en medir la respuesta motora de los animales, la cual es íntegramente medida con el Rota-rod, las mejorías comienzan a verse desde los primeros momentos y son significativas ya desde la semana 6. Esta mejoría se correlaciona con la que se observa con el trasplante de CM en la isquemia cerebral crónica, donde el comportamiento de los animales es muy similar al que observamos y donde se ve una diferencia significativa entre los grupos en la semana 4 tras el tratamiento [30]. Algo muy similar al Rota-rod ocurre con el mNSS cuando los tratamientos se realizan durante la fase aguda de la lesión, encontrándose en ambos tests y de acuerdo con estudios previos, que las diferencias significativas entre los grupos comienzan a partir del día 15 [20] o del día 14 [31]. Incluso podemos encontrar modificaciones funcionales con el mNSS, cuando se realiza un trasplante de CM a la semana del inicio de una isquemia cerebral [3]. En un estudio realizado a lo largo de un año de evolución tras una isquemia cerebral, se observó que el mNSS es capaz de detectar diferencias significativas desde el día 7 hasta los 12 meses de evolución, tras un trasplante de CM hecho en las primeras 24 horas tras la lesión [25]. Todo esto apunta a que el mNSS parece tener una gran sensibilidad y eficacia a la hora de detectar los cambios en la función neurológica, aunque la mayoría de los estudios se han desarrollado en fases tempranas tras sufrir una lesión cerebral.

Uno de los grandes problemas con los que se enfrentan las pruebas anteriores es que siempre hay una persona que debe tomar los datos de los animales, aunque normalmente se realizan dobles ciegos, y si no son personas ajenas las que realizan las pruebas nunca se puede asegurar completamente la objetividad de los datos. Por ello, se suelen usar diferentes tests donde sea un programa informático quien mida estos cambios, aunque normalmente suelen basarse en aspectos cognitivos tales como orientación o comportamiento. Estos aspectos cognitivos son menos visibles a simple vista, y por ello sus cambios a la hora de responder ante los tratamientos no suelen ser tan espectaculares como los anteriores, por lo que consecuentemente se utilizan menos. El Smart es un novedoso sistema de valoración, que nos acerca al comportamiento de los animales, ya que éstos son colocados en un cubil cerrado donde se graban sus actitudes y actividades, sin estar sometidos al estrés debido a la manipulación.



Hay diferentes pruebas que analizan aspectos similares del daño neurológico, el MWM se ha utilizado para medir la respuesta ante el trasplante de CM de ratas a las que 4 días antes se las había sometido a un TCE concluyendo que mejora el aprendizaje y la función motora, lo cual es evidente transcurrido un mes tras el tratamiento [31]. Se sabe que animales a los que se les realiza un TCE tienen déficits evidentes en su capacidad de aprendizaje y capacidad de retención en la memoria durante al menos las 8 primeras semanas tras la lesión [6]. Al realizar el TCE en los animales de experimentación, observamos diferencias evidentes en el comportamiento de los mismos cuando se analizan las imágenes a través del Smart. En nuestro presente estudio, tras realizar el trasplante de CM, tan sólo el movimiento de los animales en el cubil se vio afectado significativamente en la semana 8 post-tratamiento, no viéndose afectado el tiempo o la distancia recorrida. Posiblemente esto se debe a que el Smart es capaz de medir aspectos cognitivos que requieren tiempos de evolución más largos, y por ello posiblemente no muestre resultados espectaculares.

Por otra parte, es obvio que los distintos tests de valoración son igualmente válidos a la hora de discernir entre animales lesionados y animales sanos. Además, aquellos tests relacionados con la respuesta motora (Rota-rod y mNSS), tienen una mayor capacidad para detectar más precozmente cambios producidos en los animales cuando hacemos tratamientos en las fases crónicas de una lesión cerebral, con respecto a otros tests que miden aspectos más finos de la respuesta cognitiva (Smart, comportamiento y orientación). ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Laurer et al HL, McIntosh TK. Experimental models of brain trauma. *Curr Opin Neurol* 1999; 12:715-21.
- Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods*. 1991; 39:253-62.
- Chen J, Li Y, Wang L, Zhang X, Lu D, Lu M, Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2001; 32:1005-11.
- Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 1994; 11:187-96.
- Smith DH, Okiyama K, Thomas MJ, Claussen B, McIntosh TK. Evaluation of memory dysfunction following experimental brain injury using the Morris water maze. *J Neurotrauma* 1991; 8:259-69.
- Thompson HJ, LeBold DG, Marklund N, Morales DM, Hagner AP, McIntosh TK. Cognitive evaluation of traumatically brain-injured rats using serial testing in the Morris water maze. *Restor Neurol Neurosci*. 2006; 24:109-14.
- Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Emerging treatments for traumatic brain injury. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2009; 14:67-84.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissue. *Science* 1997; 276:71-4.
- Sánchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Stedeford T, Willing A, Freemant B, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Experimental Neurology* 2000; 164:247-56.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate to neurons. *Journal of Neuroscience Research* 2000; 61:264-370.
- Zurita M, Aguayo C, Oya S, Vaquero J. Implicación de factores neurotróficos en la transdiferenciación neuronal de células madre mesenquimales adultas. *Mapfre Medicina* 2007; 18:201-8.
- Zurita M, Vaquero J, Oya S, Bonilla C, Aguayo C. Neurotrophic Schwann-cell factors induce neural differentiation of bone marrow stromal cells. *Neuroreport* 2007; 18:1713-7.
- Zurita M, Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Vaquero J. Neural transdifferentiation of bone marrow stromal cells obtained by chemical agents is a short-time reversible phenomenon. *Neurosci Res* 2008; 60:275-80.
- 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.
- Harting MT, Jimenez F, Xue H, Fischer UM, Baumgartner J, Dash PK, et al. Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2009; 110:1189-97.
- Li Y, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 2009; 456:120-3.
- Qu C, Mahmood A, Lu D, Goussev A, Xiong Y, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in mice with marrow stromal cells. *Brain Res* 2008; 1208:234-9.
- Lu D, Mahmood A, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport* 2001; 12:559-63.



19. Lu D, Mahmood A, Qu C, Goussev A, Lu M, Chopp M. Atorvastatin reduction of intracranial hematoma volume in rats subjected to controlled cortical impact. *J Neurosurg* 2004; 101:822-5.
20. 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.
21. Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol* 2002; 1:92-100.
22. Lu J, Moochhala S, Moore XL, Ng KC, Tan MH, Lee LK, et al. Adult bone marrow cells differentiate into neural phenotypes and improve functional recovery in rats following traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 2006; 398:12-7.
23. 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.
24. Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury with a combination therapy of marrow stromal cells and atorvastatin in rats. *Neurosurg* 2007; 60:546-53.
25. Shen LH, Li Y, Chen J, Cui Y, Zhang C, Kapke A, et al. One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke. *Stroke* 2007; 38:2150-6.
26. Carter RJ, Morton J, Dunnet, SB. Motor coordination and balance in rodents. *Curr protoc Neurosci*. 2001. Chapter 8: Unit 8.12.
27. Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, Conte V, Stocchetti N, McIntosh TK. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* 2004; 28:365-78.
28. Jeong SW, Chu K, Jung KH, Kim SU, Kim M, Roh JK. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2003; 34:2258-63.
29. Yoo SW, Kim SS, Lee SY, Kim HS, Lee YD, Suh-Kim H. Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. *Exp Mol Med* 2008; 40:387-97.
30. Shen LH, Li Y, Chen J, Zacharek A, Gao Q, Kapke A, et al. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27:6-13.
31. Lu D, Mahmood A, Qu C, Hong X, Kaplan D, Chopp M. Collagen scaffolds populated with human marrow stromal cells reduce lesion volume and improve functional outcome after traumatic brain injury. *Neurosurg* 2007; 61:596-602.

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.