

El trasplante de astrocitos encapsulados mejoran el déficit motor en la habilidad manual producido por la lesión de la corteza frontal en ratas adultas

Transplant of encapsulated astrocyte ameliorate lesion-induced motor deficits in adults rats with frontal cortex injury

Heredia M, de la Fuente A, Criado JM, Jiménez-Díaz L, Yajeya J, Riobobos AS

Departamento de Fisiología y Farmacología. Facultad de Medicina-Instituto de Neurociencias de Castilla y León. Universidad de Salamanca.

Resumen

Objetivo: Investigar la capacidad de trasplantes de astrocitos encapsulados en esferas de alginato de recuperar el déficit en la habilidad manual producida por la lesión de la corteza frontal, en ratas adultas.

Material y metodología: Se utilizaron ratas Wistar, y se emplearon pruebas conductuales, cultivos celulares, técnica de encapsulación de células y trasplantes. Los animales se condicionaron en un test de habilidad motora fina y se determinó su mano preferente. Se lesionó la corteza frontal contralateral a la mano preferente y se evaluó la efectividad de la lesión mediante el test de conducta. En un grupo de animales lesionados se trasplantó astrocitos encapsulados en esferas de alginato en la cavidad producida por la lesión; en un segundo grupo, se trasplantó tejido cortical fetal; y en un tercer grupo, se implantó esferas de alginato sin células.

Resultados: A los tres meses post-trasplante, tanto los animales con trasplantes de astrocitos encapsulados como con trasplantes de tejido cortical mejoraron el déficit motor inducido por la lesión. Los animales con trasplantes de esferas de alginato vacías no experimentaron mejoría.

Conclusión: Los trasplantes de astrocitos encapsulados mejoran, a largo plazo, el déficit motor. El alginato indujo efectos secundarios en el huésped.

Palabras clave:

Corteza motora, trasplantes de astrocitos, alginato, encapsulación, rata adulta.

Abstract

Objective: To investigate whether transplants of encapsulated astrocytes in alginate spheres were able to recover the deficit in motor skills produced by frontal cortex lesion, in adult rats.

Material and method: Male Wistar rats were used. Behavioral test, tissue culture, astrocyte transplants and immunocytochemical and histological techniques were applied. Animals were conditioned in a paw reaching for food task and the preferred paw determine. Lesion was produced in the frontal cortex contralateral to the preferred paw and the effectiveness of the lesion tested. In one group of lesion animals, encapsulated astrocytes in alginate spheres were implanted in the lesion cavity; in a second group, fetal cortical tissue was used as donor material; while in a third group empty alginate spheres were implanted.

Results: Three months after grafting, the rats with encapsulated astrocyte or with fetal cortical tissue transplants ameliorated the lesion-induced motor deficit. The rats with implant of empty alginate spheres showed no improvement.

Conclusion: Transplants of encapsulated astrocytes in alginate spheres induce a long-term improvement of motor lesion deficits. The alginate induced long-term side effects on the host.

Key words:

Motor cortex, astrocyte transplants, alginate, encapsulation, adult rat.

Correspondencia

M. Heredia Chons.
Departamento de Fisiología y Farmacología.
Facultad de Medicina. Avda. Alfonso X El Sabio s/n. 37007-Salamanca.
mheredia@usal.es

Introducción

Las lesiones de la corteza motora adulta producen alteraciones graves y frecuentemente irreversibles de la función motora. Lesiones en áreas específicas de la corteza frontal de la rata producen alteraciones en la habilidad manual de las extremidades anteriores. Sin embargo, se ha demostrado la recuperación funcional de la discapacidad en la habilidad motora fina producida por la lesión de la corteza frontal, mediante trasplantes de tejido cortical embrionario, en ratas adultas [1]. Asimismo, los trasplantes de tejido embrionario amigdalino son también capaces de recuperar el déficit en la habilidad manual producida por la lesión de la corteza motora [2]. Por otra parte, hemos demostrado que el tejido trasplantado presenta respuestas electrofisiológicas a la estimulación del cerebro huésped [3], lo que sugiere que los trasplantes pueden llegar a integrarse funcionalmente con el huésped y al menos, parcialmente, restaurar los circuitos que han sido previamente dañados.

Se ha señalado que la recuperación inducida por los trasplantes corticales, de déficit conductuales producidos por la lesión de la corteza frontal en rata adulta, estaría relacionada con la producción de factores tróficos más que con el desarrollo de conexiones con el cerebro del huésped [4][5]. Hay publicaciones que sugieren que factores neurotróficos derivados de las células gliales, son los responsables de la mejoría funcional inducida por los trasplantes [6][7]. A la vista de estos datos, el objetivo del presente proyecto ha sido investigar la capacidad de trasplantes de astrocitos de recuperar el déficit en la habilidad motora fina producido por la lesión de la corteza frontal en ratas adultas. Para este estudio, hemos utilizado la tecnología de encapsulación de células en esferas de alginato ultrapurificado [8][9]. Esta nueva tecnología se considera una estrategia terapéutica prometedora para la liberación a largo plazo de sustancias biológicamente activas en distintas enfermedades, incluidas las del sistema nervioso central [10][11].

Material y metodología

Se utilizaron ratas machos, de cepa Wistar, de 200- 250 g de peso al comienzo de los experimentos. El manejo de los animales y los experimentos se realizaron de acuerdo con la Normativa Europea y el Real Decreto 1201/2005, sobre protección de los animales utilizados para experimentación. Todas las fases del diseño experimental cuentan con el informe favorable del Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

El diseño experimental constó de una fase preoperatoria; lesión de la corteza frontal; fase conductual post-lesión;

trasplante; fase conductual post-trasplante; y estudios inmunocitoquímicos e histológicos.

Los animales fueron divididos al azar en 4 grupos: 1) Animales con lesión en la corteza motora más trasplante de astrocitos encapsulados en esferas de alginato (Alg+AstG); 2) Animales con lesión en la corteza motora más trasplante de esferas de alginato sin astrocitos (vacías) (AlgG); 3) Animales con lesión en la corteza motora más trasplante de tejido cortical fetal (HomG); y 4) Animales con la corteza motora indemne (Control).

Test conductual de habilidad motora fina

Las ratas se condicionaron para ejecutar movimientos de gran precisión motora de extensión y flexión de los dígitos con el fin de obtener comida. El animal se situó en la caja de test, en sesiones individuales de 3 minutos de duración, y se cuantificó, el número de respuestas correctas (coger un «pellet» con la mano y comérselo sin que se le caiga durante el proceso) e incorrectas (cuando falla algún paso de la secuencia motora correcta) (Figura 1). Los parámetros obtenidos del test de comportamiento fueron el número total de respuestas o suma de respuestas correctas e incorrectas realizadas con ambas manos y el porcentaje de respuestas correctas sobre el número total de respuestas o porcentaje de respuestas correctas realizadas con la mano preferente (derecha o izquierda) con respecto al número total de respuestas realizadas con ambas manos.

Este test se aplicó en la fase preoperatoria para determinar

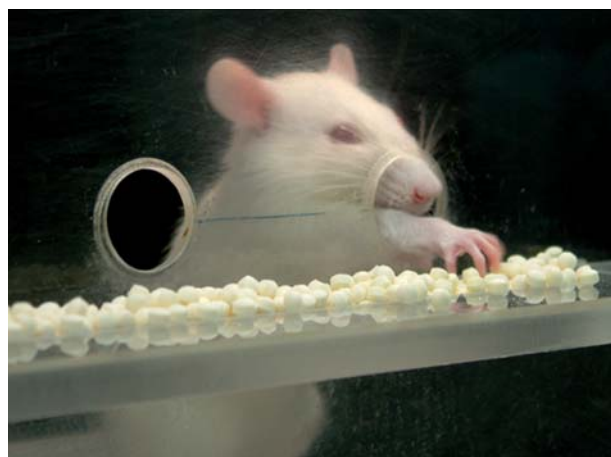


Fig. 1. Rata en la caja de test durante la realización de una respuesta, en la que el animal está introduciendo una de sus manos por un agujero de la pared frontal con el fin de coger un *pellet* de pienso. Se puede apreciar la disposición de los agujeros de la pared frontal y la posición de la bandeja de pienso.



Fig. 2. Animal con el brazalette colocado en su mano no preferente, para forzar el uso de su mano preferente para la obtención de comida, durante el test de habilidad motora fina.

la mano preferente del animal, en la fase post-lesión para comprobar la efectividad de la lesión y en la fase post-trasplante. En la fase post-trasplante, se realizó en dos periodos de tiempo: 1) A corto plazo (a los 20 días post-trasplante), y 2) A largo plazo (a los 3 meses post-trasplante). Tanto a corto como a largo plazo, el test conductual se aplicó en dos condiciones: con acceso libre a la comida con ambas manos; y con el uso obligado de la mano preferente (mano afectada por la lesión), mediante la colocación de un brazalette en la mano no preferente, el cual impedía que el animal pudiera coger los *pellets* de comida con dicha mano (Figura 2). El brazalette solo se le colocó al animal en el momento de realizar el test conductual.

Técnicas quirúrgicas

Los animales fueron anestesiados con Equitesina (1ml./250 gr. de peso corporal, intraperitoneal). Todos los animales, excepto los controles, se lesionaron unilateralmente en el área de la corteza motora correspondiente al miembro anterior [12]. La lesión se realizó por aspiración en el hemisferio contralateral a la mano preferente. Las coordenadas estereotáxicas de la lesión fueron las siguientes: anteroposterior (AP) = 1-4 mm, anterior a bregma; lateralidad (L) =1-3,5 mm, con respecto a la línea media. El límite ventral de la lesión fue el cuerpo caloso. El procedimiento para los animales controles fue idéntico, exceptuando la lesión propiamente dicha.

Sólo los animales con lesiones efectivas fueron trasplantados. En un grupo de animales, se trasplantó astrocitos encapsulados en esferas de alginato, en la cavidad de la corteza motora producida por la lesión de los animales

huéspedes; en un segundo grupo, se implantaron esferas de alginato vacías; y en un tercer grupo, se utilizó tejido cortical procedente de fetos de 16 días de desarrollo embrionario como tejido donante.

Trasplantes de astrocitos encapsulados en esferas de alginato:

Los trasplantes se obtuvieron a partir de cultivos de astrocitos procedentes del cerebro de ratas Wistar recién nacidas (P1). Los astrocitos crecieron en medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino. Los cultivos se sembraron en frascos y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada, con 5% CO₂, cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días. Posteriormente, los astrocitos fueron encapsulados en esferas de alginato ultrapurificado (alginato-LVG, Novamatrix, Noruega). Para ello, las células fueron suspendidas en una solución estéril de alginato al 1,5% (p/v), obteniéndose una densidad celular de 2 x10⁶ células/ml de alginato. Para fabricar las esferas, 10 μl de la suspensión de astrocitos se depositaron en una solución de gelación de cloruro cálcico, en condiciones asépticas. Las esferas formadas se mantuvieron en DMEM completo, a 37°C, hasta su implantación en la cavidad del huésped. El diámetro de las esferas fue cuantificado (2 mm), y su morfología e uniformidad establecida utilizando un microscopio óptico invertido equipado con una cámara. Todas las esferas, tanto con células como sin células, presentaron una morfología esférica e uniforme. Las esferas sin células se prepararon de forma idéntica, excepto que no se encapsularon astrocitos (Figura 3).

Estudios inmunocitoquímico e histológico

Para caracterizar los cultivos de astrocitos se procesaron inmunocitoquímicamente para la proteína gliofibrilar ácida (GFAP), proteína principal de los filamentos intermedios de los astrocitos maduros del SNC, utilizando un anticuerpo primario específico para la GFAP y un anticuerpo secundario conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Figura 3).

Todos los animales se procesaron aplicando técnicas de histología convencional para investigar las características histológicas de las lesiones y los trasplantes. En algunos animales se investigó la supervivencia de los astrocitos encapsulados a largo plazo (a los 10 meses post-trasplante), mediante métodos inmunocitoquímicos para la localización de la GFAP. Los animales previamente anestesiados con Equitesina, se perfundieron con dextrano al 2% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 (PB), seguido de paraformaldehído

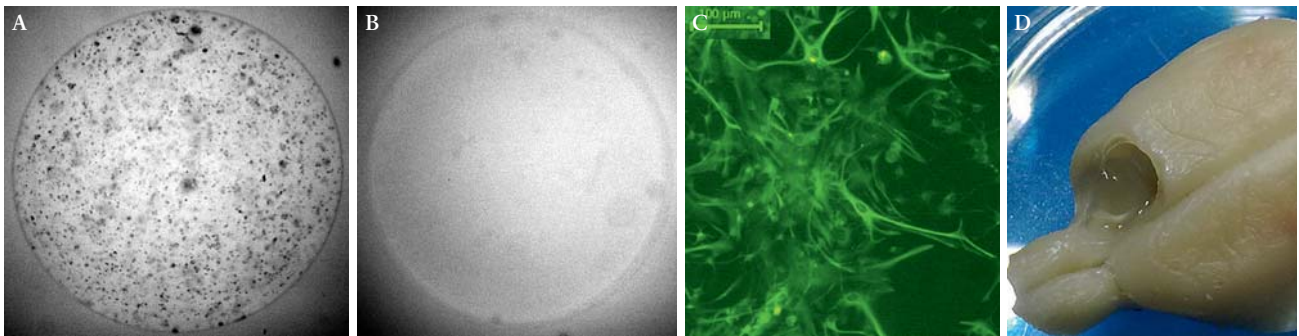


Fig. 3. A) Astrocitos encapsulados en una esfera de alginato. B) Esfera de alginato vacía. C) Cultivo de astrocitos marcados inmunocitoquímicamente para la GFAP, utilizando un anticuerpo secundario conjugado con FITC. D) Detalle de un cerebro de rata donde se observa una esfera de alginato con astrocitos encapsulados localizada en la cavidad del huésped. Se aprecia el gran tamaño de la cavidad.

al 4% en PB. Se diseccionó el cerebro y se extrajo la esfera de la cavidad. Se realizó un frotis de la esfera en un portaobjetos y se fijó con laca durante toda la noche. Luego, se fijó el frotis con paraformaldehído al 4% en PB y se procesó inmunocitoquímicamente para la GFAP, empleando el método de la avidina-biotina-peroxidasa (sistema ABC).

Análisis Estadístico

Los resultados conductuales fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Cuando el ANOVA global mostró diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$), se realizaron ANOVAs parciales para comparar los 4 grupos en cada una de las sesiones. Para comparar individualmente cada una de las medias se utilizó el test de Scheffe.

Resultados

Los trasplantes de astrocitos encapsulados mejoran el déficit motor inducido por la lesión. En la fase preoperatoria, todos los animales presentaron preferencia por el uso de una de sus manos, y fueron clasificados como diestros o zurdos cuando utilizaron, al menos en el 80% de sus respuestas correctas, la mano derecha o izquierda, respectivamente. Se consideró que los animales estaban condicionados cuando el porcentaje de respuestas correctas fue igual o superior al 60% durante 3 sesiones consecutivas. Para la distribución de los animales en los distintos grupos, se comprobó que no existieran diferencias significativas ni en el porcentaje de respuestas correctas ni en el número total de respuestas, entre los cuatro grupos (Figura 4, PRE) (Figura 5, PRE).

En la fase post-lesión, los animales se evaluaron de nuevo en el test de habilidad motora fina, para comprobar la efectividad de la lesión. Los animales lesionados presentaron

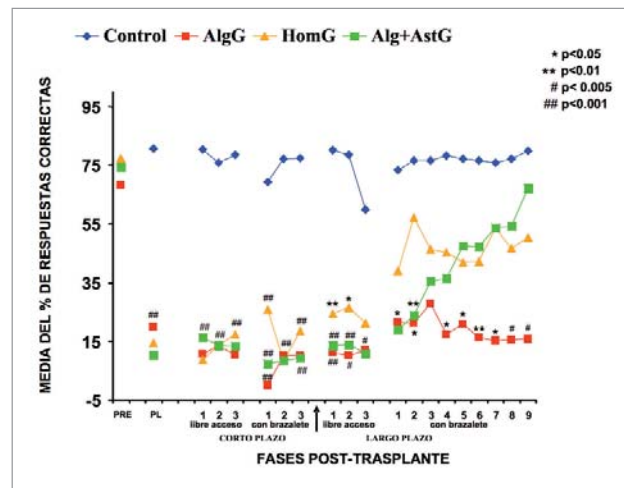


Fig. 4. Media del porcentaje de respuestas correctas con la mano preferente sobre el número total de respuestas con ambas manos, en el test de habilidad motora fina en las fases preoperatoria (PRE), post-lesión (PL) y post-trasplante. Los niveles de significación son con respecto al grupo control.

una disminución significativa del porcentaje de respuestas correctas, comparado con los controles ($p < 0,001$). Todos los animales del grupo control continuaron utilizando la mano preferente, determinada en la fase preoperatoria, mientras que los animales lesionados cambiaron de mano o disminuyeron el porcentaje de respuestas correctas sin cambiar de mano preferente. La aplicación a *posteriori* del test de Scheffe mostró una reducción significativa del porcentaje de respuestas correctas en los tres grupos de animales lesionados (Alg+AstG, AlgG y HomG) con respecto al grupo control ($p < 0,001$), mientras que no se observaron diferen-

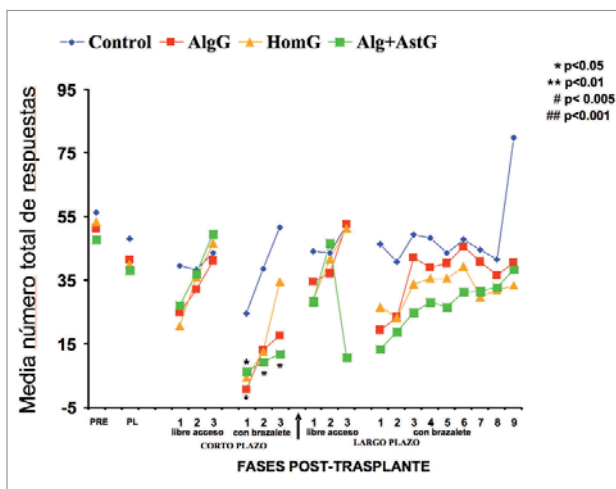


Fig. 5. Media del número total de respuestas, correctas más incorrectas, con ambas manos, en el test de habilidad motora fina en las fases preoperatoria (PRE), post-lesión (PL) y post-trasplante. Los niveles de significación son con respecto al grupo control.

cias entre ellos (Figura 4 PL). Con respecto al número total de respuestas no se observaron diferencias significativas entre los cuatro grupos (Figura 5 PL).

En la fase post-trasplante los animales fueron evaluados de nuevo en el test de habilidad motora fina, tanto a corto plazo (a los 20 días post-trasplante) como a largo plazo (a los tres meses) para valorar el efecto del trasplante.

Corto plazo: En la etapa de acceso libre los animales se ensayaron en el test de conducta durante 3 sesiones, en las mismas condiciones que en la fase preoperatoria y post-lesión; esto es, con acceso libre a la comida con ambas manos. El ANOVA puso de manifiesto diferencias significativas en el porcentaje de respuestas correctas entre los grupos ($p < 0,001$). En los 3 grupos de animales trasplantados, el porcentaje de respuestas correctas fue significativamente más bajo que en los controles. Los ANOVAs parciales, comparando los 4 grupos en cada sesión, mostraron diferencias muy significativas en las 3 sesiones ($p < 0,001$ para todas ellas). La aplicación del test de Scheffe puso de relieve que los porcentajes de respuestas correctas de los 3 grupos de animales trasplantados (Alg + AstG, AlgG y HomG) eran inferiores a los del grupo control en las 3 sesiones; sin embargo, no presentaron diferencias significativas entre ellos. (Figura 4).

En la etapa de uso obligado de la mano preferente (con brazaletes), los animales fueron evaluados en el test de conducta forzándoles a utilizar la mano preferente (mano afectada por la lesión), mediante la colocación de un brazaletes en la mano no preferente. El ANOVA global mostró dife-

rencias significativas entre los grupos ($p < 0,001$). Los ANOVAs parciales mostraron diferencias significativas entre los 4 grupos en todas las sesiones ($p < 0,001$ para las 3 sesiones). El test de Scheffe reveló un menor porcentaje de respuestas correctas en los tres grupos de animales trasplantados, estadísticamente muy significativo, comparado con los animales controles, en todas las sesiones. Sin embargo, entre los tres grupos de animales trasplantados no se observaron diferencias significativas (Figura 4).

Largo plazo: Tres meses después de la realización de los trasplantes, todos los animales fueron valorados nuevamente en el test de habilidad motora fina. Durante este periodo, un animal con trasplante de astrocitos encapsulados murió y fue eliminado de los estudios estadísticos. Cuando los animales tuvieron acceso libre a la comida, el ANOVA mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos ($p < 0,001$). Cuando se compararon los cuatro grupos en cada sesión se observaron diferencias significativas en las tres sesiones ($p < 0,001$). El porcentaje de respuestas correctas de los tres grupos de animales trasplantados (Alg+AstG, HomG y AlgG) fue inferior al del grupo control en todas las sesiones, excepto en la tercera sesión, en la cual los animales con trasplante de tejido cortical no mostraron diferencias significativas con respecto a los controles. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los animales trasplantados (Figura 4).

Cuando los animales fueron obligados a utilizar la mano afectada por la lesión (con brazaletes), el ANOVA global mostró diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,005$). Los animales con trasplantes de astrocitos encapsulados presentaron una mejoría notable en el déficit motor; así, su porcentaje de respuestas correctas no presentó diferencias significativas comparado con los controles en todas las sesiones, excepto en las dos primeras. El porcentaje de respuestas correctas de los animales con trasplantes de tejido cortical fue similar al de los animales controles en las 9 sesiones, no existiendo diferencias significativas entre ambos grupos. Por el contrario, los animales con trasplantes de esferas de alginato sin células (vacías), no presentaron mejoría, mostrando diferencias significativas con respecto a los controles en las 9 sesiones, excepto en la tercera (Figura 4).

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de respuestas correctas entre los tres grupos de animales trasplantados (Alg + AstG, HomG y AlgG), excepto en las dos últimas sesiones, en las cuales los animales con trasplantes de astrocitos encapsulados presentaron un mayor porcentaje de respuestas correctas, estadísticamente significativo, comparado con los animales con trasplantes de esferas de alginato vacías.

En la fase post-trasplante, el número total de respuestas fue similar entre los cuatro grupos, no existiendo diferencias estadísticamente significativas, excepto en la etapa a corto plazo, con brazaletes, en la cual el número total de respuestas de los animales con trasplantes de astrocitos encapsulados fue inferior al de los animales controles en las tres sesiones; y en la primera sesión, los animales con trasplantes de esferas de alginato vacías también mostraron diferencias significativas respecto a los controles (Figura 5).

La tasa de supervivencia de los trasplantes de tejido cortical fue del 100%, a los tres meses de la realización del trasplante. La cavidad producida por la lesión se presentó rellena por tejido neural relativamente bien organizado.

En los animales con trasplantes de esferas de alginato, tanto con astrocitos encapsulados como vacías, se presentaron, sistemáticamente, problemas en el proceso de perfusión intracardiaca del fijador, quedando suprimida la perfusión a los pocos minutos de su comienzo. Esta circunstancia, no se presentó ni en los animales con trasplantes de tejido cortical fetal ni en los animales controles, y es la primera vez que se presenta en nuestro laboratorio. Tras la extracción del cerebro se comprobó que el cerebro no había quedado correctamente fijado. Para intentar resolver este problema se realizaron distintos ensayos, siendo la inyección intraperitoneal de heparina, una hora antes de perfusión, el único método que lo subsanó parcialmente. A la vista de estos datos, realizamos un ensayo del tiempo de coagulación en algunos animales con trasplantes de astrocitos encapsulados y lo comparamos con el de animales controles, para investigar alteraciones en el proceso de hemostasia. Los resultados obtenidos mostraron que en los animales con trasplantes de astrocitos encapsulados, el tiempo de coagulación fue menor que en los animales controles, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$) (datos no presentados).

En el 100 % de los animales con trasplantes de esferas de alginato (con astrocitos encapsulados o vacías), a los siete meses de la realización de los trasplantes, las esferas de alginato permanecían en la cavidad donde se habían trasplantado. Cuando las esferas se extrajeron de la cavidad y se introdujeron en un medio líquido, se disolvieron en pocos minutos. Para investigar este fenómeno se introdujeron esferas de alginato preparadas *de novo* en distintos medios (fijador, medio de cultivo, solución de Krebs, etc). Tras cinco meses, se pudo comprobar que las esferas permanecían en los distintos medios sin alteraciones visibles.

La supervivencia de los astrocitos encapsulados se investigó a los 10 meses post-trasplante, utilizando métodos inmunocitoquímicos para la localización de la GFAP, no ob-

servándose células GFAP positivas en ninguna de las esferas investigadas.

En la mayoría de los animales con trasplantes de esferas de alginato (con astrocitos encapsulados o vacías), se pudo constatar, a largo plazo (a los 10 meses post-trasplante), un aumento sustancial en el tamaño de la lesión comparado con el que presentaba en el momento del trasplante (Figura 3).

Discusión

La lesión de la corteza frontal indujo una discapacidad en la habilidad manual en los animales lesionados, valorada en el test de habilidad motora fina, en concordancia con estudios previos [1][2]. La lesión de la mano preferente, determinada en la fase preoperatoria, y la comprobación de la efectividad de la lesión, son dos requisitos, a nuestro modo de ver, imprescindibles para valorar inequívocamente el efecto de los trasplantes.

Los animales con trasplantes de tejido cortical fetal presentaron una notable mejoría funcional en el déficit en la habilidad manual producida por lesión, cuando los animales fueron forzados a utilizar la mano afectada por la lesión, resultados que confirman estudios previos [1][2].

El objetivo principal del presente estudio era determinar si trasplantes de astrocitos encapsulados en esferas de alginato eran capaces de mejorar el déficit motor producido por la lesión. Los resultados obtenidos han demostrado que los trasplantes de astrocitos encapsulados indujeron una mejoría funcional en la discapacidad en la habilidad motora fina producida por la lesión, que se manifestó cuando los animales fueron forzados a utilizar la mano afectada por la lesión, a largo plazo. Así, en todas las sesiones, excepto en dos, el porcentaje de respuestas correctas de los animales con trasplantes de astrocitos no mostraron diferencias significativas con los controles. Asimismo, los animales con trasplantes de astrocitos encapsulados no presentaron diferencias significativas con los animales con trasplantes de tejido cortical en la ejecución del test de habilidad motora fina, lo que sugiere que los beneficios conductuales de ambos tipos de trasplantes sobre la discapacidad en la habilidad manual producida por la lesión fueron similares. Por otra parte, el porcentaje de respuestas correctas de los animales con trasplantes de astrocitos o con trasplantes de tejido cortical no mostró diferencias significativas, comparado con él de los animales con trasplantes de esferas de alginato vacías, excepto en las dos últimas sesiones, que sí se presentaron diferencias significativas. Estos resultados sugieren una gran variabilidad individual en la ejecución del test de habilidad motora en

los animales trasplantados, lo que conlleva una notable dispersión de los datos dentro de cada grupo.

Se ha señalado que la lesión de la corteza frontal puede producir una hiperactividad motora generalizada [13], habiéndose implicado esta hiperactividad motora en la mejoría inducida por los trasplantes. Nuestros resultados demuestran que la mejoría funcional inducida por los trasplantes, tanto de astrocitos encapsulados como de tejido cortical, no estaría determinada por un aumento de la hiperactividad motora, dado que la actividad general de todos los animales en el test de habilidad motora, valorada por el número total de respuestas, fue similar en los cuatro grupos en cada una de las fases del diseño experimental, excepto en los animales con trasplantes de astrocitos, los cuales en la etapa post-trasplante a corto plazo, con brazaletes, presentaron un menor nivel de actividad.

Hasta el presente, desconocemos los mecanismos involucrados en la mejoría funcional inducida por los trasplantes de astrocitos encapsulados sobre el déficit en la habilidad motora fina producida por la lesión. No obstante, esta mejoría podría estar determinada con la liberación de factores tróficos por los astrocitos encapsulados y/o por el huésped, cuyos beneficios en el huésped se pusieron de manifiesto a largo plazo y con el uso obligado de la mano afectada por la lesión. El factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF), se ha relacionado con la mejoría de déficits conductuales tras una lesión, en diversos modelos experimentales de enfermedades del SNC, siendo los astrocitos reactivos su fuente principal [6][7][14]. Por tanto, el GDNF podría estar involucrado en los beneficios de los trasplantes de astrocitos encapsulados, en nuestro modelo experimental.

Otro aspecto que se ha puesto de evidencia en nuestro estudio ha sido los efectos secundarios del alginato. En la actualidad, los alginatos son los materiales biocompatibles más utilizados debido a su baja inmunogenicidad y baja toxicidad [11]. En el presente estudio, hemos utilizado alginato biocompatible ultrapurificado para la elaboración de las esferas y el proceso se realizó en condiciones asépticas [9]. No obstante, en los animales con trasplantes de esferas de alginato se indujo, a largo plazo, un aumento sustancial en el tamaño de la lesión, producido, posiblemente, por la puesta en marcha de una respuesta inmune en el huésped. Además, los animales con trasplantes de alginato presentaron trastornos en la coagulación. En pacientes con una lesión cerebral traumática, se presentan sucesos tromboembólicos frecuentemente tras la lesión, los cuales se tratan profilácticamente con heparina, y se consideran una manifestación de una coagulación intravascular diseminada [15]. Este estado hipercoagulable tras una lesión cerebral

traumática se achaca, entre otras causas, a la liberación del factor tisular (el cual se cree existe en el cerebro en niveles muy elevados), y a los niveles elevados de otros factores pro-coagulantes tales como el factor von Willebrand y a plaquetas activadas. Podemos especular con la idea de que la puesta en marcha de una reacción inmune en el huésped frente al alginato determinaría procesos de muerte celular en las áreas adyacentes a la lesión, que conllevarían el aumento sustancial del tamaño de la lesión en los animales con trasplantes de esferas de alginato, y la liberación de factor tisular por las células dañadas, lo que causaría los trastornos en la coagulación que se observan en estos animales. No obstante, serían necesarias más investigaciones para profundizar en estos aspectos. ■

Agradecimientos

Los autores agradecen a Doña Noelia González y a Don Javier Blanco por su excelente asistencia técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Riobobos AS, Heredia M, de la Fuente JA, Criado JM, Yajeya J, Campos J, et al. Functional recovery of skilled forelimb use in rats obliged to use the impaired limb after grafting of the frontal cortex lesion with homotopic fetal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 2001; 75:274-92.
2. Heredia M, Riobobos AS, de la Fuente JA, Criado JM, Yajeya J. Recuperación de la habilidad motora mediante trasplantes neurales en ratas adultas con lesión de la corteza frontal. *Trauma FUNDACIÓN MAPFRE* 2009; 20:137-43.
3. Santos-Torres J, Heredia M, Riobobos AS, Jiménez-Díaz L, Gómez-Bautista V, De la Fuente JA, et al. Electrophysiological and synaptic characterization of transplanted neurons in rat motor cortex. *J Neurotrauma* 2009; 26:1593-607.
4. Labbe R, Firl A, Mufson EJ, Stein DG. Fetal brain transplant: reduction of cognitive deficits in rats with frontal cortex lesions. *Science* 1983; 221:470-2.
5. Kesslak JP, Nieto-Sampedro M, Globus J, Cotman CW. Transplants of purified astrocytes promote behavioral recovery after frontal cortex ablation. *Exp Neurol* 1986; 92:377-90.
6. Bresjanac M. Neurotransplantation induced plasticity in the CNS: focusing in the recipient response. *Eur J Physiol* 2000; 440:163-5.
7. Toledo-Aral JJ, Méndez-Ferrer S, Pardal R, Echevarría M, López Barneo J. Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long-term carotid body-grafted parkinsonian rats. *J Neurosci* 2003; 23:141-8.

8. Orive G, Gascón AR, Hernández RM, Igartua M, Pedráz JL. Cell microencapsulation technology for biomedical purposes: novel insights and challenges. *Trends in Pharmacological Sciences* 2003; 24:207-10.
9. Orive G, Carcaboso AM, Hernández RM, Gascón AR, Pedraz JL. Biocompatibility evaluation of different alginates and alginate-based microcapsules. *Biomacromolecules* 2005; 6:927-31.
10. Emerich DF, Thanos CG, Goddard M, Skinner S, Geany MS, Bell WJ, et al. Extensive neuroprotection by choroids plexus transplants in excitotoxin lesioned monkeys. *Neurobiol Diseases* 2006; 23:471-80.
11. Murua A, de Castro M, Orive G, Hernández RM, Pedráz JL. In vitro characterization and in vivo functionality of erythropoietin-secreting cells immobilized in alginate – poly – L – lysine - alginate microcapsules. *Biomacromolecules* 2007; 8:3302-7.
12. Neafsey EJ, Bold EL, Haas G, Hurley-Gius KM, Quirk G, Sievert CF, et al. The organization of the rat motor cortex: a microstimulation mapping study. *Brain Res* 1986; 1:77-96.
13. Justice A, Moran TH, Deckel AW, Robinson RG. The use of fetal neocortical transplants to treat the hyperactivity resulting from cortical suction lesions in adult rats. *Behav Brain Res* 1989; 110:803-12.
14. Shen LH, Li Y, Chopp M. Astrocytic endogenous glial cell derived neurotrophic factor production is enhanced by bone marrow stromal cell transplantation in the ischemic boundary zone after stroke in adult rats. *Glia* 2010; 58:1074-81.
15. Dudley RR, Aziz I, Bonnici A, Saluja RS, Lamoureux J, Kalmovitch B, et al. Early venous thromboembolic event prophylaxis in traumatic brain injury with low-molecular-weight heparin: Risks and benefits. *J Neurotrauma* 2010; 27:2165-72.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.