

INVESTIGACIÓN

INVESTIGACIÓN

2008



**USO DE BIOMATERIALES CON FINES
ANGIOGÉNICOS EN EL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL TRAS DAÑO
CEREBRAL**

FUNDACIÓN MAPFRE

www.fundacionmapfre.com

Investigador Principal

José Miguel Soria López

Dr. en Neurociencias
Profesor Universidad CEU-Cardenal Herrera

Equipo Investigador

Francisco Bosch-Morell

Profesor
Universidad CEU-Cardenal Herrera

Francisco Javier Romero Gómez

Profesor
Universidad CEU-Cardenal Herrera

José Miguel Barcia González

Becario
Universidad CEU-Cardenal Herrera

Índice

	Página
1. RESUMEN	4
2. OBJETIVOS PLANTEADOS	4
3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	4
4. MATERIAL Y MÉTODOS	5
5. RESULTADOS	6
5.1. Estabilidad del pH y condiciones de cultivo	6
5.2. Cultivo de fibroblastos sobre biomateriales	6
5.3. Cultivo de células HUVEC sobre biomateriales poliméricos	7
5.4. Cultivo de células neurales sobre biomateriales poliméricos	7
5.5. Implante de biomateriales en cerebro adulto de rata	8
5.6. Estudio de implante cerebral tras lesión cortical por criolesión	9
6. EXPOSICIÓN NACIONAL E INTERNACIONAL DE LOS RESULTADOS ALCANZADOS	10
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11

1. RESUMEN

Las lesiones producidas a partir de traumatismos craneoencefálicos provocan por lo general una pérdida importante de masa cerebral, neuronas, glía y vasos sanguíneos y constituyen algunas de las causas más comunes en la generación de procesos de discapacidad o minusvalía neurológica. Por el momento este tipo de lesiones carecen de una estrategia clínica efectiva para su tratamiento. La medicina regenerativa pretende en estos casos una aproximación basada en el trasplante celular. Éste debe contar con una estructura soporte de las células que permita su emplazamiento y comportamiento funcional. Por ello resulta de la mayor importancia identificar materiales sintéticos, biodegradables y estables, compatibles con el tejido cerebral, y capaces de favorecer procesos angiogénicos que garanticen la formación de vasos sanguíneos en su interior para una adecuada supervivencia celular.

2. OBJETIVOS PLANTEADOS

OBJETIVO 1: Cultivo, expansión y caracterización de células endoteliales HUVEC sobre biomateriales

1. Cultivo in vitro de células HUVEC y caracterización de poblaciones celulares mediante técnicas de citometría de flujo e inmunocitoquímica para determinar subpoblaciones celulares
2. Cultivo y expansión de células endoteliales HUVEC sobre materiales poliméricos lisos y sin canales.
3. Cultivo y expansión de células HUVEC sobre biomateriales tridimensionales y con canales en todas direcciones y determinación de la adhesión y supervivencia celular en el interior de los canales in vitro.

OBJETIVO 2: viabilidad de implante en animales wild type.

1. Evaluación in vivo de procesos de rechazo y gliosis en animales wild type tras implante de biomateriales poliméricos

OBJETIVO 3: Aplicación de biomateriales triimensionales y con canales en modelo experimental con daño cerebral

Tras el implante biomateriales poliméricos con estructura de hidrogel se procederá a la evaluación de su potencial para revascularizar áreas lesionadas en corteza cerebral de rata adulta .

Se realizará en dos modelos:

- i) Ratas no isquémicas en donde una porción cortical lesionada será sustituida por el biomaterial
- ii) Ratas isquémicas en donde parte de una porción lesionada cortical será sustituida por el biomaterial.

3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Las lesiones producidas a partir de traumatismos craneoencefálicos provocan por lo general una pérdida importante de masa cerebral, neuronas, glía y vasos sanguíneos y constituyen algunas de las causas más comunes en la generación de procesos de discapacidad o minusvalía neurológica. Este fenómeno es debido a la pérdida de poblaciones neuronales y conexiones locales interneuronales. (Davenport and Dennis, 2000; Vannucci and Perlman, 1997). Aunque hasta el momento se han estudiado numerosas estrategias de reconstrucción basadas en el uso de células troncales, lo cierto es que no existe ninguna clínicamente efectiva. (Davenport and Dennis, 2000; Sharp, 1997; Vannucci and Perlman, 1997). Para poder establecer una buena estrategia en términos de regeneración o reconstrucción, habría que resolver dos cuestiones esenciales, identificar las poblaciones celulares idóneas que regeneren las áreas dañadas y que esas células se integren en el tejido hospedador. El primer problema podría resolverse con las células troncales del propio cerebro. Justo hace una década, se pensaba que el cerebro no regeneraba. Pero actualmente sabemos que se producen nuevas neuronas en el cerebro de humanos y ya ha sido identificada la naturaleza de dichas células troncales.

En la actualidad son dos las estrategias posibles a seguir, a) cultivar y diferenciar in vitro dichas células troncales y luego trasplantarlas, y b) activarlas in vivo y que en el propio cerebro se diferencien. En el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos y durante estadios fetales y adultos, las células troncales neurales, pueden ser obtenidas a partir de epitelios germinativos, siendo la zona subventricular (ZSV) una de las zonas principales de neurogénesis en el periodo postnatal y en adulto. (Alvarez-Buylla and García-Verdugo, 2002). Una vez extraídas, estas células pueden proliferar in vitro generando agregados celulares denominados neuroesferas. Además, estas células, tienen la capacidad de diferenciarse en neuronas y células gliales mediante uso de medios de cultivo específicos. De este modo, las células troncales neurales implantadas en tejido cerebral lesionado podrían reemplazar o sustituir poblaciones neuronales y conexiones dendríticas a la vez que liberar factores tróficos y sustancias de la matriz que ayuden a la reconstitución del parénquima en donde fueron implantadas (Gorski et al., 2002; Park et al., 2002). Sin embargo en aquellos casos en los que hay una pérdida severa de tejido se generan auténticas cavidades císticas, que imposibilitan la reconstrucción tisular, siendo imprescindible una previa organización intrínseca que ayude a la reconstrucción; Es decir se hace necesaria la presencia de una estructura a modo de andamio o "scaffold" que permita una mínima organización de las células trasplantadas. (Park et al., 2002). Sabemos que durante la neurogénesis, la arborización dendrítica y el crecimiento axonal se realiza siguiendo un sistema de soporte-guía proporcionado por la glía radial (Ang et al., 2003; Rakic, 2000), o lo

que es lo mismo material vivo compatible. Se podría sustituir esta función glial con el uso de materiales biocompatibles artificiales (biomateriales) porosos, que permitan el paso a través de su pared de agua y nutrientes. En este sentido, el uso de biomateriales en el campo de la biomedicina es cada vez más prometedor, planteando nuevas estrategias que constituyen una alternativa para la generación de muchos tejidos y estructuras como rótulas o como moldes para el crecimiento óseo al promover la adhesión celular y una correcta diferenciación celular. (Letic-Gavrilovic et al., 2003; Polimeni et al., 2004).

En la actualidad gran cantidad de trabajos muestran la posibilidad de usar biomateriales específicos y con distinta naturaleza químico-física con fines regenerativos en el sistema nervioso. Sin embargo, la mayor parte de ellos vienen referidos a sistema nervioso periférico. (Freed et al., 2001) y hay relativamente pocos que se utilicen en estrategias regenerativas del sistema nervioso central y la mayoría de ellos, se centran en la regeneración de estructuras cuyas fibras están geoméricamente ordenadas como la médula espinal o el nervio óptico (Teng et al., 2002).

Por otro lado, los polímeros, tanto de origen natural como sintético, se han utilizado relativamente poco en la reconstrucción del SNC. En este sentido han sido utilizados por algunos grupos de investigación matrices de colágeno con agentes neuroactivos, tubos de poli (acrilonitrilo-cloruro de vinilo), o hidrogeles sintéticos como estructura soporte, obteniendo resultados esperanzadores (Ramon-Cueto et al., 1998).

Nuestro grupo ha seleccionado una serie de biomateriales biocompatibles con estructura de hidrogel que permiten una adecuada diferenciación neural *in vitro* e *in vivo* (ANEXO I). Así, células troncales neurales procedentes de áreas proliferativas del cerebro de rata se diferencian en neuronas y células gliales sobre estos biomateriales siendo capaces de colonizarlos (Soria et al 2006, Soria et al 2007) generando neuronas funcionalmente activas (Martines Ramos et al 2008). Estos materiales basados en específicas combinaciones de etil-acrilato e hidroxietil acrilato, también han sido usados en nuestro laboratorio como soporte de células de glia procedente de nervio periférico, indicando su potencial en estrategias regenerativas. (Soria et al, 2007). Sin embargo, además de un sistema scaffold que permita una organización celular en el parénquima cerebral se hace necesaria la presencia de nutrientes y oxígeno para la supervivencia neuronal en el interior del scaffold, Es decir, es necesario que nuevos vasos sanguíneos del parénquima cortical colonicen el biomaterial implantado asegurando así la supervivencia celular del sistema. Trabajos realizados por el grupo de investigación de O. Lindvall muestran que tras fenómenos de isquemia cerebral, células progenitoras procedentes de SVZ, son capaces de abandonar el nicho neurogénico y migran hacia la zona cortical infartada, en un tentativo de regenerar aquellas zonas lesionadas. Sin embargo, la falta de vascularización oxígeno y nutrientes de la zona infartada así como la ausencia de un soporte celular, genera la

muerte progresiva de aquellas células madre neurales que migraron desde svz. (Arvidsson et al., 2002). Recientes experimentos desarrollados en nuestro laboratorio gracias a un proyecto concedido por la FUNDACION MAPFRE, demuestra la viabilidad de construir nuevos biomateriales con estructuras de hidrogel y con capacidad de ser reabsorbidos tras un periodo de tiempo, lo que implica una mejora sustancial para una adecuada regeneración del tejido nervioso.

Este proyecto se configura como una continuación de un proyecto anterior concedido por MAPFRE pero intentando dar un paso más en la difícil tarea de diseñar una estrategia regenerativa en el Sistema nervioso Central. Por tanto, el objetivo principal de este proyecto está enfocado a la utilización de biomateriales que garanticen la entrada de vasos sanguíneos que favorezcan procesos de supervivencia celular en el interior del scaffold. De este modo, el proyecto solicitado se divide en tres fases: En una primera fase se evaluará *in vitro* la viabilidad de los biomateriales para ser colonizados por células humanas endoteliales vasculares (HUVEC) En una segunda fase, se atenderá a la evaluación *in vivo* del uso de biomateriales poliméricos en el sistema nervioso central para la revascularización de zonas lesionadas del parénquima cerebral, por último se aplicaran los materiales con mejores resultados en un modelo de lesión cerebral y se implantaran en la zona de penumbra que rodea al foco de lesión y que resulta susceptible de recuperación.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

OBJETIVO 1: Cultivo, expansión y caracterización de células endoteliales HUVEC sobre los biomateriales.

Mediante técnicas de cultivo estándar para HUVEC, se procederá a la expansión de estas sobre biomateriales y se valorará su adhesión y proliferación celular mediante métodos cuantitativos. Los núcleos de todas las células adheridas serán teñidos con DAPI y cuantificados en 10 áreas de 0,004 cm² obtenidas al azar sobre la superficie de biomateriales con forma de discos lisos de 5mm de diámetro. Las pruebas se realizarán durante 1, 5 y 10 días de cultivo *in vitro*. Cuando los materiales sean de estructura acanalada (canales de 90 micras). Los biomateriales serán cortados, con el fin de acceder a la vista interior de los canales, mediante técnicas de histología y posteriormente las células serán contadas en el interior de los canales. Se determinará la capacidad del biomaterial para ser tapizado por células de endotelio el interior de los canales.

OBJETIVO 2: Viabilidad de implante en animales wild type.

Para determinar la viabilidad de los biomateriales *in vivo*, y analizar procesos de rechazo, se procederá al implante de biomateriales en porciones corticales y tras 10 días 15 días y 1 mes se analizarán los procesos de gliosis me-

diente inmunocitoquímica para GFAP, analizaremos además la presencia de edemas e inflamación mediante técnicas de histología.

OBJETIVO 3: Aplicación de biomateriales tridimensionales y con canales en modelo experimental con daño cerebral

- Modelos animales:

1. Ratas Wistar y SD wild type

Para la realización de los estudios "in vivo", se emplearán ratas Wistar y SD (Charles River)

2. Animales con isquemia cerebral.

Se empleará un modelo de isquemia cerebral mediante criolesión selectiva en la corteza cerebral de rata puesto a punto en nuestro laboratorio. Con el fin de obtener distintos grados de isquemia, se procederá al implante tras diversos tiempos después del daño cerebral. La detección de la zona infartada en los animales intervenidos se determinará mediante tinción triphenyltetrazoliumchloride (TTC). Este modelo, esta puesto a punto en nuestro laboratorio.

- Implante cerebral de biomateriales.

El implante de biomateriales en la corteza cerebral se realizara mediante cirugía intracraneal en el área de penumbra que rodea al foco de lesión y que estará situado concretamente en el area somatosensorial a nivel de las capa 4-5. Para el implante, utilizaremos coordenadas estereotácticas adecuadas para estandarizar el método.

De este modo el implante se realizará en una zona de penumbra en la que existen algunos vasos sanguíneos capaces de proliferar y regenerar una zona dañada, el biomaterial hara de puente entre zonas semisanas.

- Estudio histológico para determinar el grado de revascularización.

El estudio se realizará mediante técnicas de inmunocitoquímica y microscopia electrónica y confocal.

El implante de biomateriales en la corteza cerebral será analizado mediante inmunocitoquímica e histología. Así, tras fijación por perfusión, se procederá a la postfijación para la conservación del tejido cerebral. Tras la disección del cerebro transplantado, este será incluido y cortado en secciones mediante el uso de criostato, vibratomo y micrótopo. El estudio histológico se realizará mediante microscopía óptica, fluorescente confocal y electrónica para determinar detalles ultraestructurales. Se realizarán tinciones inespecíficas (Nissl), para obtener una visión general del implante así como tinciones por immuno-

histoquímica. Se utilizaran los marcadores descritos con anterioridad en la sección de experimentos in vitro e in vivo.

Esta evaluación será llevada a cabo en profundidad mediante el uso de microscopia confocal y electrónica.

5. RESULTADOS

5.1. Estabilidad del pH y condiciones de cultivo.

Tras la fabricación de biomateriales se procedo a la incubación de estos en medio de cultivo provisto de rojo fenol. No se observaron cambios de pH debido a la liberación de sustancias acidas por parte del biomaterial. Para ello se utilizaron materiales basados fundamentalmente en combinaciones de polímeros etil acrilato e hidroxietil acrilato, combinaciones de estos polímero en distintas proporciones fueron incubados durante 1, 3 , 6 y 10 dias para comprobar su toxicidad sobre el medio de cultivo (n= 10 para cada caso). En estos caso el Ph no se modificó en absoluto tras el periodo de cultivo. Por otra parte biomateriales basados en acido hialurónico fueron testados para comprobar su viabilidad en términos de PH, transcurridos 3 días de cultivo, se observo una ligera variación en el Ph producto de una acidificación del medio. En este caso se procedió a 5 lavados de 3 minutos en agua destilada y uno final de 30 minutos en medio de cultivo. Transcurridos estos lavados pudimos comprobar su equilibrio de forma que nunca mas se observó irregularidad en la variación del pH tras el cultivo. No obstante se procedió al cultivo de células para determinar el grado de viabilidad y supervivencia así como adhesión celular.

5.2. Cultivo de fibroblastos sobre biomateriales.

Con el fin de determinar la viabilidad celular sobre los mencionados biomateriales, se procedió al cultivo de fibroblastos sobre discos de biomateriales basados en combinaciones de etil acrilato e hidroxietil acrilato, y también sobre discos de biomateriales formados por acido hialurónico.

De este modo fibroblastos de ratón fuero cultivados (50.000 células/cm²) sobre discos de 5mm durante 6 dias en medio de cultivo que contenia 10% FBS, Gentamicina (50mg/ml), en medio DMEM (Sigma Aldrich). Las células se mantuvieron en cultivo a 37°C y con una oxigenación de 95%CO₂ y 5% O₂. Durante el tiempo de cultivo las células fueron observándose mediante microscopio invertido. Con el fin de mostrar la viabilidad del cultivo la Figura 1 muestra como las células (fibroblastos) ocuparon la mayor parte de la superficie expuesta por el material.

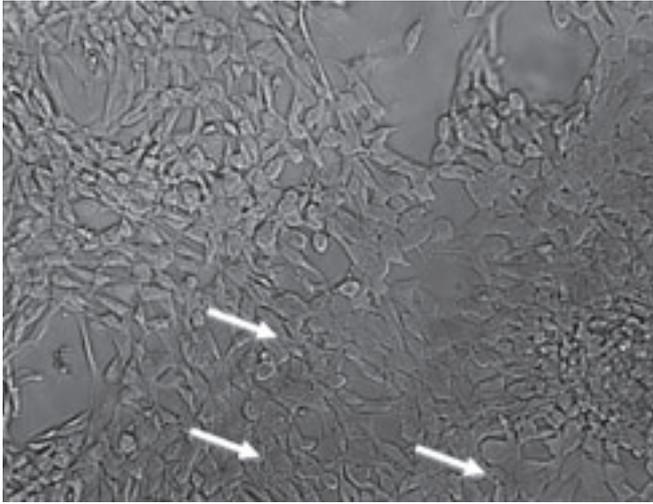


Figura 1. Muestra fibroblastos de ratón cultivados sobre biomaterial liso basado en ácido hialurónico. Las células continuaron en división durante el tiempo de cultivo y transcurridos 6 días se llegó a la perfecta confluencia concluyendo la viabilidad de los biomateriales.

5.3. Cultivo de células HUVEC sobre biomateriales poliméricos

Con el fin de determinar la viabilidad de estos biomateriales basados en ácido Hialurónico así como aquellos basados en Etil acrilato e hidroxietil acrilato, células HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) (LONZA) fueron cultivadas in Vitro durante 1, 5 y 10 días de cultivo ($n=10$ para cada caso). Los materiales utilizados fueron de carácter lisos paeor también tridimensionales y con canales. El resultado del cultivo tras 10 días se muestra en la Figura 2.

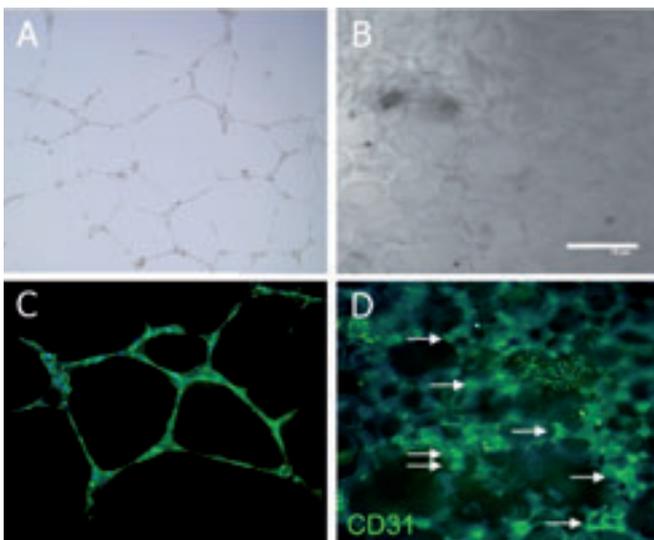


Figura 2. Células HUVEC humanas cultivadas sobre biomaterial liso polimérico basado en etil acrilato e hidroxietil acrilato (A,C). Las células formaron redes a modos de microvasos sanguíneos. Las células mostraron inmunoreactividad para el marcador CD31, típico de células endoteliales. Cuando se probaron biomateriales tridimensionales basados en canales (B), las células mostraron ocupar los huecos mostraron adhesión celular sobre la superficie del material (flechas blancas en D).

De este modo podríamos concluir que los biomateriales diseñados eran aptos para la supervivencia y viabilidad de estas células endoteliales humanas **respondiendo así al objetivo 1 diseñado en la fase experimental.**

5.4. Cultivo de células neurales sobre biomateriales poliméricos

Con el fin de mejorar la adhesión celular los diferentes biomateriales empleados (discos lisos de 5 mm de diámetro), fueron recubiertos con Fibronectina.

De este modo, los distintos biomateriales se depositaron en placas P96 e incubados con y sin Fibronectina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (solución stock 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma P-0899) a 37°C y 5% de CO_2 durante 3 horas para facilitar la adhesión de este tipo celular. Posteriormente se procedió al lavado de los biomateriales mediante 3 incubaciones en agua destilada con el fin de retirar restos de fibronectina. Entonces células neurales disociadas y procedentes de rata adulta tras la generación de neuroesferas (Martínez Ramos y cols 2008) fueron cultivados (50.000c/cm²) sobre la superficie de los biomateriales. Transcurridos 3 días de cultivo, numerosas células neurales con aspecto fusiforme fueron observados sobre aquellos biomateriales recubiertos por fibronectina e incluso en el interior de los canales que conforma el biomaterial (Figura 1) Además pudimos descartar la liberación de sustancias tóxicas por parte del biomaterial al encontrar células neurales en el fondo de la placa de cultivo y bajo el biomaterial. Como se puede apreciar en la figura 1, las células neurales fueron teñidas con DAPI, que marcó sus núcleos y facilitó la identificación de las células en el interior de los canales del biomaterial tras el cultivo in vitro. El material tras el cultivo fue observado bajo microscopio de fluorescencia Olympus. La obtención de las imágenes permitieron comprobar la naturaleza del biomaterial polimérico colonizado por las células neurales.

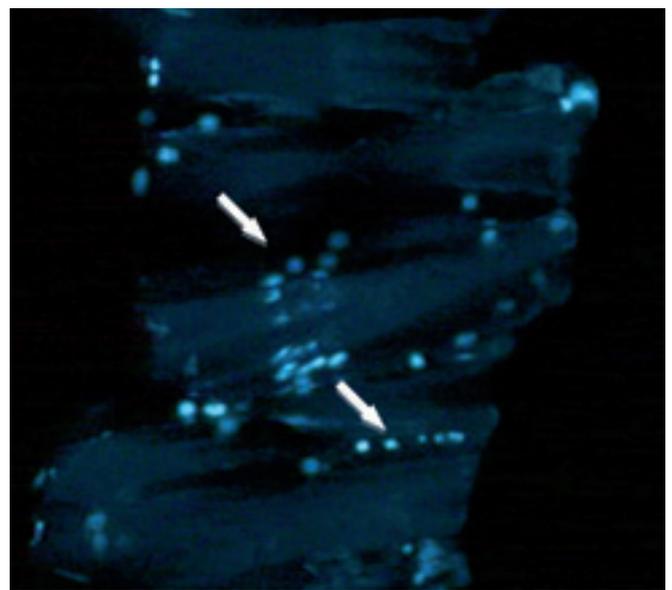


Figura 3. Células neurales cultivadas sobre biomateriales muestran su internalización en el interior de los canales del scaffold. Los núcleos de las células fueron marcadas con DAPI.

Como se puede apreciar en la figura 3, las células neurales fueron teñidas con DAPI, que marcó sus núcleos y facilitó la identificación de las células en el interior de los canales del biomaterial tras el cultivo in vitro. El material tras el cultivo fue observado bajo microscopio de fluorescencia Olympus. La obtención de las imágenes permitieron comprobar la naturaleza del biomaterial polimérico colonizado por las células neurales. Este tipo de experimentos constituyeron un paso previo antes de proceder al implante de los biomateriales in vivo. En Figura 4 se puede observar como estas células fueron además inmunoreactivas para el marcador neuronal Tuj1.

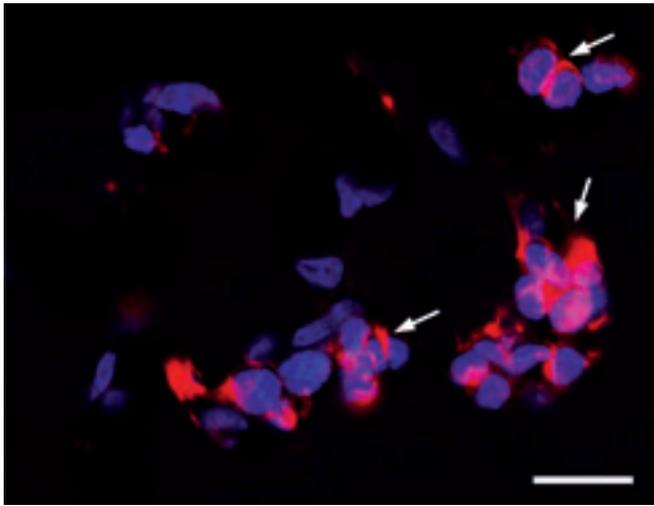


Figura 4. Células neurales cultivadas sobre biomateriales muestran su internalización en el interior de los canales del scaffold. Los núcleos de las células fueron marcadas con DAPI el citoplasma se marco con Tuj1 indicando su naturaleza neuronal. barra de escala: 100um

5.5. Implante de biomateriales en cerebro adulto de rata.

Los resultados obtenidos responde al objetivo 2 establecido en la fase experimental

Todos los animales fueron mantenidos en un estabulario con acceso a comida y agua ilimitada en una habitación que fue mantenida a una temperatura (19-22°C) y humedad (40-50%) constante siguiendo un ciclo de 12:12 horas de luz/oscuridad. Se escogieron ratas macho Wistar (n=20) con un peso comprendido entre 250-300g. Los animales fueron anestesiados con una solución anestésica

compuesta de clorhidrato de ketamina (Ketolar., Parke-Davis S.L.) (75 mg/Kg), diazepam (Valium. 10, Roche Farma S.A.) (7.5 mg/Kg) y sulfato de atropina (Atropina Braun, Braun Medical S.A.) (0.15 mg/Kg). La anestesia se mantuvo con una mezcla de halotano (Fluothane, Zeneca Farma S.A.) 0.5 - 0.75% en N₂O y O₂ (70:30, respectivamente). Se rasuró con máquina eléctrica la zona a intervenir, pincelando toda el área con una solución al 10.0 % de polividona yodada.

Con el objetivo de estudiar la biocompatibilidad de estos biomateriales poliméricos se implantaron en la corteza cerebral biomateriales rectangulares con una dimensión de 4x1x1 mm.

Una vez anestesiado el animal, se colocó en un estereotáxico inmovilizando así el cráneo. A continuación se realizó una incisión en el cerebro y tomamos como referencia el bregma, ajustando el estereotáxico como coordenada 0,0 .

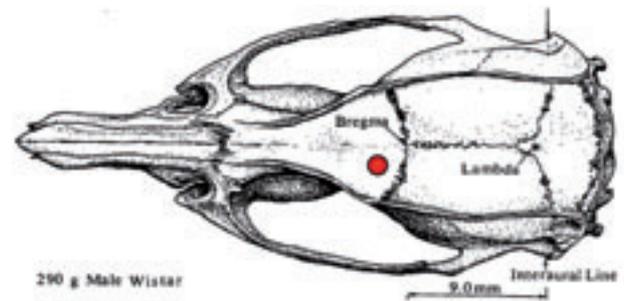


Figura 5. Esquema del cráneo de una rata Wistar indicando donde está la coordenada de implante.

Con ayuda del Atlas de Paxinos y Watson se movieron las coordenadas para realizar implantes de estos sustratos artificiales con el fin de estudiar la gliosis y procesos de rechazo. Mediante técnicas quirúrgicas se procedió al implante del biomaterial tras la realización de un trepano o perforación del cráneo. Así pues, se implantó el biomaterial con ayuda de forceps de microcirugía.

Transcurridos 30 días desde el implante del biomaterial tridimensional basado en etil acrilato y hidroxietil acrilato con canales procedimos a la tinción con hematoxilina/eosina para determinar la posición del biomaterial y analizar la posible colonización celular desde el parenquima cortical.

Como se puede observar en la Figura 6, numerosas células colonizaron el biomaterial en su interior regenerando el interior de los canales y espacios del biomaterial.

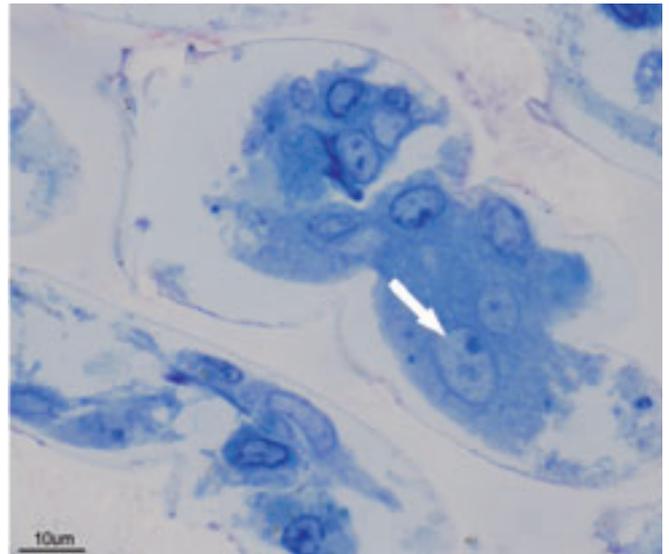
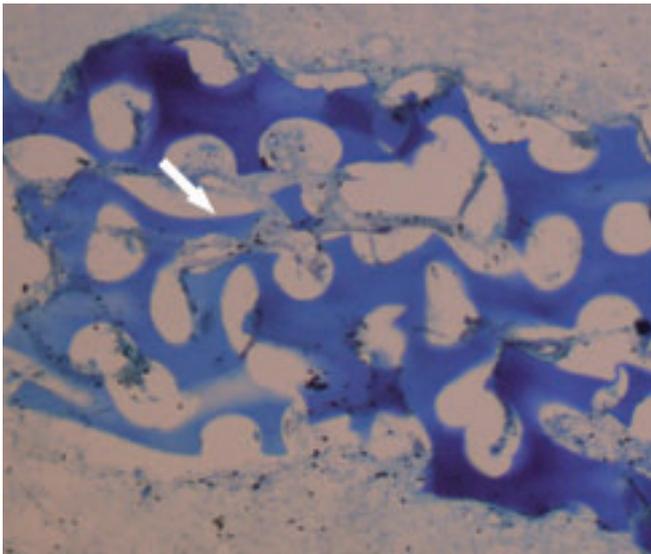


Figura 6. Como se observa en la figura de la izquierda, numerosas células invadieron el interior del biomaterial polimérico basado en etil acrilato y hidroxietil acrilato con canales implantado (flechas blancas), además se observó un adecuado contacto e integración del biomaterial acanalado con el parenquima cerebral. En detalle (a la derecha) y mediante el empleo de semifinos teñidos con azul de toluidina, se pueden apreciar detalles celulares que denotan el buen estado que sugiere una adecuada viabilidad celular tras el periodo de implante

Por otra parte se procedió al análisis in vivo (Figura 7) tras el implante de biomateriales basados en ácido hialurónico, los cuales sustituyeron una porción cortical. Tras tinción con hematoxilina y eosina e inmunocitoquímica para el marcador neuronal Tuj1, pudimos observar un entramado celular con gran presencia de vasos sanguíneos. Mediante inmunocitoquímica pudi-

mos observar la presencia de neuronas en el interior del entramado celular puramente endotelial. **De este modo se responde al objetivo 2**, de forma que los resultados muestran una recuperación parcial del área sustituida por un biomaterial. Las células de carácter endotelial y neural invadieron el material acanalado implantado.

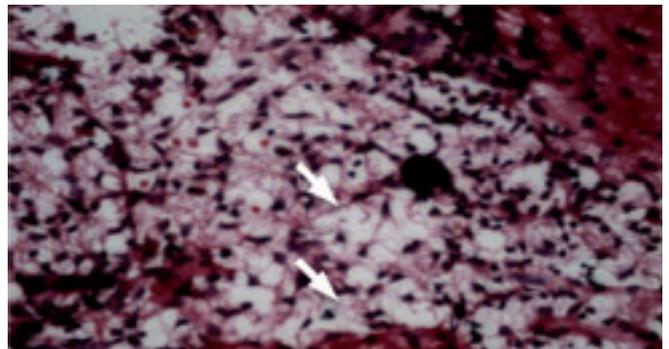
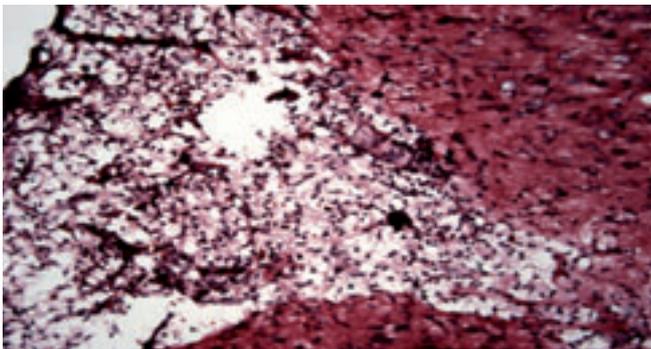


Figura 7. Como se observa en la figura numerosas células (flechas blancas), invadieron el interior del biomaterial de hialurónico implantado. Además se observó un adecuado contacto e integración del biomaterial acanalado con el parenquima cerebral. En marrón parduzco se muestran las células inmunoreactivas para Tuj1.

5.6. Estudio de implante cerebral tras lesión cortical focal.

Los resultados obtenidos en este apartado responden al objetivo 3 establecido en la fase experimental.

El tratamiento quirúrgico fue descrito con anterioridad en el punto 6.5. La diferencia en este caso es que el implante se realizó transcurrida una hora desde un daño por criolesión en la corteza cerebral. Una lanceta criocongelada en nitrógeno líquido fue introducida mediante esterotaxia 300µm en el interior de la corteza siguiendo

las coordenadas establecidas en 6.5. En estas condiciones se mantuvo durante 1 minuto, para permitir la actuación de una lesión por congelación tras contacto entre la lanceta y el parénquima cerebral. Tras este proceso se procedió a la retirada de la lanceta y el animal (n=10) permaneció anestesiado durante una hora. Con posterioridad se procedió al implante de biomateriales poliméricos. Del mismo modo otro grupo de animales (n=10) sufrieron criolesión y pero no se les implantó el biomaterial acanalado.

Transcurridos 30 días desde el implante analizamos mediante técnicas de inmunocitoquímica los tipos celulares contenidos en el interior de los biomateriales. Así y en primer lugar y mediante inmunocitoquímica contra el marcador GFAP revelamos el estado de la lesión transcurridos 30 días en animales que sufrieron lesión cortical y no fueron tratados con biomaterial. (n=10) Como se puede observar en figura 4 una fuerte cicatriz glial rodeo a la cavidad cística generada tras la lesion, en el interior se materializo una zona no inmunoreactiva que indicaba un fuerte proceso de edema e inflamación. Futuros experimentos podrian ir encaminados a determinar con mas detalle este fenómeno.

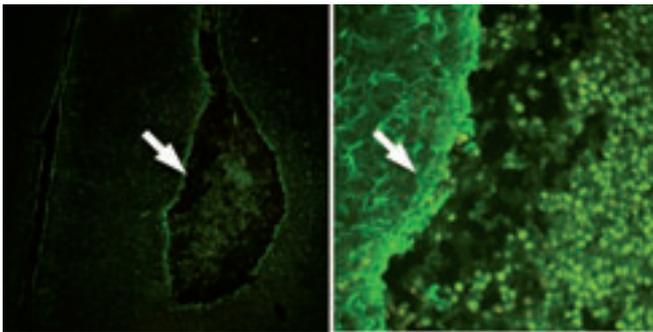


Figura 8. Transcurrido un mes, numerosos astrocitos inmunoreactivos para GFAP (en verde) forman una cicatriz glial en torno a la lesion generada (flecha blanca), indicando un grave daño cerebral. En detalle (derecha) podemos observar como los astrocitos se establecen en torno a la superficie neural dañada

En aquellos animales que fueron transplantados con biomateriales Figura 9 encontramos que la regeneracion neural en el interior de los biomateriales iba acompañada de la nueva generación de células gliales que iniciaban su función de scaffold para la regeneración completa de tejido neural. Además se vio que iniciaban a rodear a los vasos sanguíneos en lo que supondría la neo-formación de la barrera hematoencefálica.

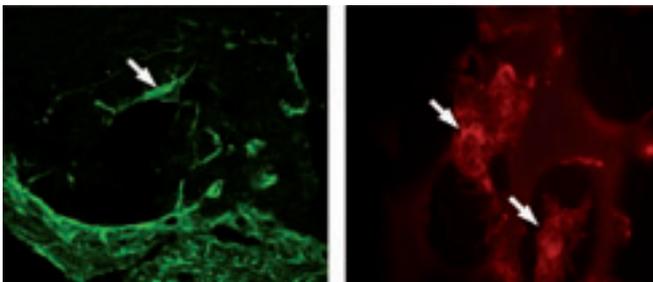


Figura 9. En detalle se observa como los astrocitos (izquierda en verde) comienzan a adentrarse en el nuevo tejido neural, para ejercer su papel como células de sosten. La zona mas marcada e inmoreactiva (parenquima cortical) con tacta con el material mplantado(mas oscuro), los astrocitos se internan ocupando el interior de los canales del biomateriales A la derecha (en rojo) se observan nuevos vasos sanguíneos inmunoreactivos para CD31 invadiendo la zona del biomaterial implantado en las inmediaciones de los canales que conforman el biomaterial.

Tras inmunocitoquímica para el marcador neuronal Tuj1 y el marcador CD31 y mediante microscopía confocal pu-

dimos observar el proceso final por el que los biomateriales fueron colonizados por neuronas y por células endoteliales, tras el implante de biomateriales acanalados poliméricos en la corteza cerebtral tras criolesión. Así, como se muestra en la figura 10, numerosas neuronas colonizaron el biomaterial junto con numerosas células endoteliales procedentes de vasos sanguíneos colindantes. Las células neurales procedieron en cualquier caso de lugares neurogénicos como la Zona Subventricular, la cual estaba bajo el biomaterial implantado. En futuros estudios seria de gran interes observar con detalle si la colonización de los biomateriales por parte de las neuronas jóvenes es posterior a la de los vasos sanguíneos, y si en verdad una vez generada una gran red vascular en el interior de los biomateriales ocurre entonces una colonización neural.

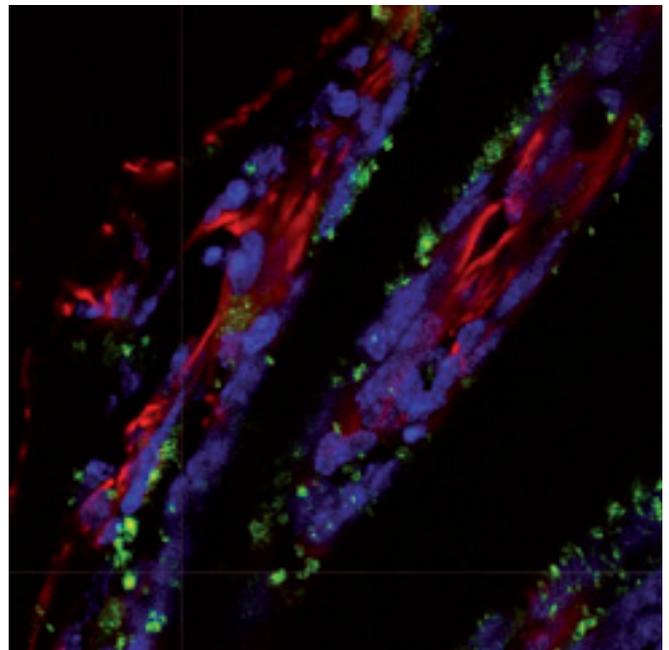


Figura 10. Biomateriales acanalados basados en polímeros de etilacrilato e hidroxietilacrilato fueron implantados en corteza cerebral de rata adulta ras criolesión. Transcurrido un mes desde la lesión, se practicó inmunocitoquímica para Tuj1(rojo) y CD31 (verde). Tras análisis mediante microscopía fluorescente y confocal, se aprecia la coexistencia de células neurales junto con células endoteliales en el interior de los canales del biomaterial sugiriendo un proceso de regeneración neural.

6. EXPOSICIÓN INTERNACIONAL DE RESULTADOS ALCANZADOS.

- Los resultados alcanzados en este proyecto han sido mostrados en el programa de conferencias científicas de la Universidad CEU-Cardenal Herrera 2009-2010.
- XV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular. III International Congress of Histology and Tissue Engineering, 8-11 de Julio 2009. Albacete. Título de la conferencia: "Grafted Channeled Scaffolds into adult rat Brain allow local an-

- giogenesis and Neural Stem Cell differentiation” by Soria JM et al. Premiado con honorary mention.*
- XIX Congreso de Neurocirugía del Levante. Noviembre 2009, Valencia. Título de la conferencia: “Grafted Chanelled Scaffolds into adult rat Brain allow local angiogenesis and Neural Stem Cell differentiation” ” by Soria JM et al
 - Por otro lado los nuevos resultados alcanzados serán presentados en el próximo VII Congreso Internacional de Neurociencias (FENS) Federation of European Neuroscience Societies que se desarrollará en Amsterdam el próximo Julio de 2010. El abstract desarrollado por nuestro equipo de investigación y aceptado por el comité científico de la FENS avala los resultados obtenidos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez-Buylla, A. and Garcia-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22, 629-34.
- Ang, E. S., Jr., Haydar, T. F., Gluncic, V. and Rakic, P. (2003). Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J Neurosci* 23, 5805-15.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8(9):963-70.
- Bayol-Denizot, C., Daval, J. L., Netter, P. and Minn, A. (2000). Xenobiotic-mediated production of superoxide by primary cultures of rat cerebral endothelial cells, astrocytes, and neurons. *Biochim Biophys Acta* 1497, 115-26.
- Davenport, R. and Dennis, M. (2000). Neurological emergencies: acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68, 277-88.
- Freed, C. R., Greene, P. E., Breeze, R. E., Tsai, W. Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J. Q. et al. (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344, 710-9.
- Fried K, Sime W, Lillesaar C, Virtanen I, Tryggvasson K, Patarroyo M. Laminins 2 (alpha2beta1gamma1, Lm-211) and 8 (alpha4beta1gamma1, Lm-411) are synthesized and secreted by tooth pulp fibroblasts and differentially promote neurite outgrowth from trigeminal ganglion sensory neurons. *Exp Cell Res*. 2005 Jul 15;307(2):329-41.
- Gorski, J. A., Talley, T., Qiu, M., Puellas, L., Rubenstein, J. L. and Jones, K. R. (2002). Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J Neurosci* 22, 6309-14.
- Gorski, J. A., Zeiler, S. R., Tamowski, S. and Jones, K. R. (2003). Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *J Neurosci* 23, 6856-65.
- Harman, K., Katnick, J., Lim, R., Zaheer, A. and de la Torre, J. C. (1991). Glia maturation factor beta stimulates axon regeneration in transected rat sciatic nerve. *Brain Res* 564, 332-5..
- Labrador, R. O., Buti, M. and Navarro, X. (1998). Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp Neurol* 149, 243-52.
- Letic-Gavrilovic, A., Piattelli, A. and Abe, K. (2003). Nerve growth factor beta (NGF beta) delivery via a collagen/hydroxyapatite (Col/HAp) composite and its effects on new bone ingrowth. *J Mater Sci Mater Med* 14, 95-102.
- Li Y, Decherchi P, Raisman G. (2003) Transplantation of olfactory ensheathing cells into spinal cord lesions restores breathing and climbing. *J Neurosci*. 23, 727-31
- Park, K. I., Teng, Y. D. and Snyder, E. Y. (2002). The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. *Nat Biotechnol* 20, 1111-7.
- Lillesaar C, Arenas E, Hildebrand C, Fried K. Responses of rat trigeminal neurons to dental pulp cells or fibroblasts overexpressing neurotrophic factors in vitro. *Neuroscience*. 2003;119(2):443-51.
- Lillesaar C, Arenas E, Hildebrand C, Fried K. Responses of rat trigeminal neurons to dental pulp cells or fibroblasts overexpressing neurotrophic factors in vitro. *Neuroscience*. 2003;119(2):443-51.
- Lillesaar C, Eriksson C, Johansson CS, Fried K, Hildebrand C. Tooth pulp tissue promotes neurite outgrowth from rat trigeminal ganglia in vitro. *J Neurocytol*. 1999 Aug;28(8):663-70.
- Martínez-Ramos C, Lainez S, Sancho F, García Esparza MA, Planells-Cases R, García Verdugo JM, Gómez Ribelles JL, Salmerón Sánchez M, Monleón Pradas M, Barcia JA, Soria JM. Differentiation of postnatal neural stem cells into glia and functional neurons on laminin-coated polymeric substrates. *Tissue Eng Part A*. 2008 Aug;14(8):1365-75.
- Nosrat IV, Widenfalk J, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev Biol*. 2001 Oct 1;238(1):120-32.
- Nosrat IV, Smith CA, Mullally P, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur J Neurosci*. 2004 May;19(9):2388-98.
- Polimeni, G., Koo, K. T., Qahash, M., Xiropaidis, A. V., Albandar, J. M. and Wikesjo, U. M. (2004). Prognostic factors for alveolar regeneration: effect of a space-providing biomaterial on guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 31, 725-9.
- Rakic, P. (2000). Radial unit hypothesis of neocortical expansion. *Novartis Found Symp* 228, 30-42; discussion 42-52.
- Ramon-Cueto, A., Plant, G. W., Avila, J. and Bunge, M. B. (1998). Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci* 18, 3803-15..
- Rodriguez, F. J., Verdu, E., Ceballos, D. and Navarro, X. (2000). Nerve guides seeded with autologous schwann cells improve nerve regeneration. *Exp Neurol* 161, 571-84.
- Sharp, F. (1997). Transplant for stroke patients? *Ann.Neurol*, 322-323.
- Snyder, E. Y. (2002). Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3024-9.
- Soria, J. M., Tagliatela, P., Gil-Perotin, S., Galli, R., Gritti, A., García Verdugo, J. and Bertuzzi, S. (2005). Defective postnatal neurogenesis and disorganization of the rostral migratory stream in absence of the Vax1 homeobox gene. *Journal of Neuroscience* 25.
- Soria JM, Martínez Ramos C, Bahamonde O, García Cruz D. M., Salmerón Sánchez M., García Esparza M. A., Casas C, Guzmán, M., Navarro X, Gómez Ribelles J. L., García Verdugo J. M, Monleón Pradas M. and Barcia J. A.. Influence of the substrate's hydrophilicity on the in vitro Schwann cells viability. *J Biomed Mater Res A*. (in press 2007)
- Soria JM, Martinez Ramos C, Salmeron Sanchez M, Benavent V, Campillo Fernandez A, Gomez Ribelles JL, Garcia Verdugo JM, Pradas MM, Barcia JA.. Survival and differentiation of embryonic

- neural explants on different biomaterials. *J Biomed Mater Res A*. Dec 1;79(3):495-502 (2006)
- Trubiani O, Orsini G, Caputi S, Piatelli A. Adult mesenchymal stem cells in dental research: a new approach for tissue engineering. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2006 Jul-Sep;19(3):451-60. Review.
- Vannucci, R. C. and Perlman, J. M. (1997). Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 100, 1004-14.
- Verdu, E., Garcia-Alias, G., Fores, J., Lopez-Vales, R. and Navarro, X. (2003). Olfactory ensheathing cells transplanted in lesioned spinal cord prevent loss of spinal cord parenchyma and promote functional recovery. *Glia* 42, 275-86.
- Verdu, E., Labrador, R. O., Rodriguez, F. J., Ceballos, D., Fores, J. and Navarro, X. (2002). Alignment of collagen and laminin-containing gels improve nerve regeneration within silicone tubes. *Restor Neurol Neurosci* 20, 169-79.

Conflicto de intereses

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