

Influencia del grado de lesión neurológica sobre la eficacia de la terapia celular en un modelo de traumatismo craneoencefálico grave

Influence of the level of neurological deficit on the efficacy of cell therapy in a model of severe traumatic brain injury

Bonilla C¹, Zurita M¹, Otero L¹, Aguayo C¹, Rico MA¹, Vaquero J^{1,2}

¹ Unidad de Investigación Neurociencias. ² Servicio de Neurocirugía, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Determinar si el nivel de déficit neurológico influye en la eficacia de la terapia celular con células madre mesenquimales (CMM) de la médula ósea en un modelo experimental crónico de lesión cerebral traumática.

Material y métodos: Se sometió a ratas Wistar adultas a un modelo de lesión cerebral traumática. Dos meses después, se clasificaron en función de su nivel de déficit neurológico mediante dos tests funcionales: Escala de valoración sensitivo-motora y Tiempo de permanencia en la zona interior (Video-Tracking-Box test, VTB test). Se inyectó suero salino solo o CMM en suero salino en el tejido cerebral dañado de los animales que obtuvieron la clasificación neurológica de lesión moderada o grave según el nivel permanente de su déficit funcional. Todos los animales se evaluaron durante los dos meses siguientes para determinar la posible eficacia de la administración de las CMM. Al finalizar el estudio, los animales se eutanasiaron y se estudiaron sus cerebros.

Resultados: Se constata una recuperación funcional significativa en los animales con lesión moderada que recibieron las CMM, pero no en los animales con lesión grave cuando se compara con los controles.

Conclusiones: Las conclusiones obtenidas sugieren que la gravedad de la lesión neurológica puede influir en la potencial eficacia de la terapia celular cuando es aplicada en una lesión cerebral traumática crónica.

Palabras clave:

Lesión traumática cerebral, terapia celular, células madre mesenquimales de la médula ósea.

Abstract

Objective: To study if the level of neurological deficit influences the efficacy of cell therapy with bone marrow stromal cells (BMSC), in an experimental model of chronic traumatic brain injury (TBI).

Material and methods: Adult Wistar rats were subjected to a model of traumatic brain injury. Two months later they were classified according to their level of neurological deficit. For that, two functional tests: Scale of sensory-motor assessment and time spent in the inner zone in the Video-Tracking-Box test, were used. Saline alone or BMSC in saline was injected into the damaged brain tissue of animals suffering a permanent level of functional deficit classified as moderate or severe. All experimental groups were evaluated during the next two months to determine the potential effectiveness of the intracerebral administration of BMSC. At the end of the study animals were euthanized and their brains were studied.

Results: The results show a significant functional recovery in animals with moderate injury who received BMSC, but there was no significant recovery in animals with severe traumatic brain injury when compared with controls.

Conclusion: The severity of neurologic injury may influence the potential efficacy of cell therapy applied to chronic TBI.

Key words:

Traumatic brain injury, cell therapy, bone marrow stromal cells.

Correspondencia

J. Vaquero
Unidad de Investigación Neurociencias y Servicio de Neurocirugía
Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid.
Joaquín Rodrigo 2. 28222 Majadahonda, Madrid.
jvaquero@telefonica.net

I Introducción

El daño cerebral traumático es la principal causa de muerte y discapacidad en los países desarrollados [1]. Los pacientes que sobreviven a una lesión cerebral causada como consecuencia de un traumatismo craneoencefálico (TCE) pueden sufrir pérdidas en su función motora y sensorial, cuyo alcance dependerá de la severidad del trauma.

En la actualidad están cobrando importancia creciente las terapias celulares potencialmente aplicables al tratamiento de lesiones y enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC). Las CMM obtenidas de la médula ósea han sido utilizadas en diferentes estudios experimentales para tratar enfermedades y lesiones del SNC [2-6], y actualmente son un fuerte candidato para tratar las secuelas producidas como consecuencia de un daño cerebral traumático.

Las CMM son relativamente fáciles de obtener y pueden ser expandidas en cultivos para la realización de trasplantes autólogos en pacientes. Se sabe que la administración de CMM tiene efectos beneficiosos sobre la recuperación funcional de ratas sometidas a una lesión cerebral cuando los tratamientos se realizan dentro de la primera semana tras el trauma [7-9]. Previamente hemos demostrado que la administración intralesional de CMM mejora la recuperación funcional en ratas con una evolución de la lesión cerebral de dos meses, es decir, cuando la terapia se realiza en fases tardías o crónicas de la lesión cerebral [10]. También se sabe que, tras los trasplantes, las CMM sobreviven y expresan fenotipos neurales y gliales dentro del propio tejido cerebral [7-10].

En un esfuerzo de trasladar los resultados obtenidos en los modelos experimentales a lo que se observa dentro de la clínica humana, pretendemos estudiar si la gravedad y magnitud de los déficit neurológicos asociados a una lesión cerebral pueden afectar a la efectividad de las terapias celulares utilizadas. Para ello pretendemos desarrollar protocolos de terapia celular a través de la administración de CMM, y estudiar si dichas terapias pueden o no ser efectivas en función de los diferentes niveles de deterioro neurológico de los animales. Se utilizarán diferentes tests de valoración neurológica para intentar determinar las diferencias en la posible recuperación funcional entre los diferentes niveles de lesión cerebral y entre los animales tratados con CMM y los controles.

I Material y métodos

Modelo de lesión cerebral traumática

Se utilizaron 50 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 se guió en su caída a través de un cilindro hueco, adaptado al área de la craneotomía, lo que permite realizar una lesión que se define como el producto del peso de la barra por la altura desde la cual se deja esta caer.

Valoración neurológica

Se dejó evolucionar a los animales dos meses, momento en el que se determina la gravedad de la lesión neurológica a través de dos tests neurológicos.

La Escala de valoración sensitivo-motora, que tiene una puntuación máxima de 19 puntos, es una escala modificada de citas previas de la literatura conocida como *Neurological Severity Score* (NSS) [7,8,11]. Cuenta con una serie de valoraciones que abarcan las funciones motora y sensorial, el test de equilibrio de viga y la medida de ausencia de reflejos.

Para una valoración más objetiva de la función neurológica se utilizó un nuevo método de valoración que consta de un soporte informático (Smart) unido a una cubículo donde se captan imágenes de vídeo (VTB test). A través del VTB test podemos estudiar la función neurológica de los animales, ya que se cuantifican parámetros del comportamiento como la actividad motora y la orientación. Este método ha sido usado en nuestro laboratorio para cuantificar la recuperación funcional en ratas Wistar adultas con una lesión cerebral adquirida como consecuencia de una hemorragia intracerebral [12], o una lesión traumática [13]. El VTB test analiza las imágenes captadas a través de una videocámara colocada en la base de una caja cerrada de 35x45 cm de base sobre la que se colocan los animales susceptibles de ser evaluados. Una mayor puntuación o más tiempo dentro de la zona de estudio se asocia a daño cerebral grave en ratas (Tiempo de permanencia en la zona interior).

Grupos experimentales según el nivel de lesión

Según los resultados anteriores, los animales fueron agrupados en tres niveles de lesión cerebral crónica: leve, media o moderada y grave. Los animales con lesión leve se retiraron del estudio, puesto que su poco deterioro neurológico hace complicado el estudio de la efectividad de las terapias celulares para tratar las secuelas del daño cerebral traumático.

Los grupos experimentales para tratar de determinar la efectividad de dichas terapias dentro de los niveles de lesión cerebral se establecieron como sigue:

Animales con lesión leve:

Animales que fueron retirados del estudio.

Animales con lesión moderada:

- Grupo 1 (50% de los animales con lesión moderada): trasplante intralesional de 5 millones de CMM en suero fisiológico.
- Grupo 2 (50% de los animales con lesión moderada): trasplante intralesional de suero fisiológico.

Animales con lesión grave:

- Grupo 3 (50% de los animales con lesión grave): trasplante intralesional de 5 millones de CMM.
- Grupo 4 (50% de los animales con lesión grave): trasplante intralesional de suero fisiológico.

Obtención de CMM del estroma de la médula ósea

Para la obtención de las CMM se usaron ratas Wistar macho adultas de entre 200 y 250 g de peso. Tras sacrificar los animales 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), se extrajo la médula ósea mediante lavado de los huesos con 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 ribonucleótidos ni deoxi-ribonucleótidos, así como con 20% FBS. Posteriormente, las células de la médula ósea se disgregaron mediante pipeteado y se filtraron a través de una malla de nylon de 70µm. La suspensión celular resultante se sometió a recuento en cámara de Neubauer mediante el test de viabilidad del azul tripán y se subcultivaron en frascos de 75 cm² en una concentración 160.000 células/cm² en una estufa a 37°C con 5% CO₂. A las 72 horas de incubación, el sobrenadante se retiró y fue sustituido por medio nuevo. Cuando las células alcanzaron un desarrollo cercano a la confluencia, se levantaron del frasco de cultivo. La suspensión celular obtenida se resuspendió en medio alfa-MEM completo/10%FBS y fue sometida a recuento nuevamente. 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, se levantaron células correspondientes a un primer pase (P1) en condiciones estériles. Las células obtenidas tras

ser centrifugadas, a 1200 rpm, durante 15 minutos, se lavaron con suero fisiológico y fueron sometidas a recuento celular. Una vez realizado el recuento, se centrifugaron nuevamente 5x10⁶ CMM a 1000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, el botón celular obtenido para el trasplante se diluyó en suero fisiológico al volumen requerido, aproximadamente 30 µL.

Administración de las CMM

Tras conocer los resultados anteriores (dos meses desde la lesión), se intentó determinar cómo influye el grado de lesión en la eficacia de las terapias celulares. Para ello, las ratas se anestesiaron con isoflurane al 4% en N₂O:O₂ (70:30). La anestesia se mantuvo mediante isoflurane al 1-2% en N₂O:O₂ (70:30) y durante el procedimiento 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, se administraron intralesionalmente 5 millones de células madre obtenidas de médula ósea de ratas macho donantes o suero fisiológico, según los criterios antes establecidos y el grupo experimental correspondiente.

Evolución neurológica según el nivel de lesión cerebral

Para llevar a cabo el seguimiento de la efectividad de los tratamientos según el nivel neurológico se realizaron los tests descritos anteriormente (Escala de valoración sensitivo-motora y VTB test, Tiempo de permanencia de los animales dentro de un área concreta). Se tomaron los datos de la evolución de los animales tratados con CMM y de los animales controles de los dos niveles de lesión (animales con lesión moderada y animales con lesión grave), con periodicidad semanal, y se analizó la capacidad de detectar los cambios entre los grupos.

Estudios histológicos

Al término del estudio, tras sacrificar a los animales, se estudiaron los aspectos macroscópicos e histológicos de la zona cerebral donde se había llevado a cabo el trasplante. La técnica histológica usada fue la de hematoxilina-eosina.

Análisis estadístico

Utilizando como referencias las escalas de recuperación y de coma de Glasgow, se establecieron tres niveles de gravedad de la lesión: leve, media o moderada y grave. Para ello se utilizó el soporte informático SPSS (versión 15.0), donde se estudiaron los diagramas de frecuencia de los datos obtenidos con los dos tests de valoración obtenidos al finalizar

los dos meses de evolución de la lesión cerebral. Los datos obtenidos con las diferentes escalas de la evolución neurológica tras los tratamientos se analizaron también estadísticamente a través del soporte informático SPSS (versión 15.0), donde se realizó una t de Student.

Resultados

Establecimiento de los niveles de lesión cerebral crónica

En el diagrama de frecuencia de la Escala de valoración sensitivo-motora (Figura 1) se observan tres picos que nos permitieron agrupar los datos en tres conjuntos: un primer conjunto correspondiente a los animales que obtuvieron menos de 4 puntos en la escala de valoración neurológica y que recoge un total de 6 ratas; un segundo conjunto que va de 4 a 9 puntos, donde se concentra el mayor grueso de datos, con un total de 33 ratas, y un tercer conjunto de datos que corresponde a aquellos animales que obtuvieron más de 9 puntos en dicha escala y que abarca un total de 11 ratas.

Aquel conjunto de datos correspondiente a los animales que obtuvieron menor puntuación fue asignado al grupo de animales con lesión leve. Los animales agrupados en el segundo conjunto de datos se asignaron al grupo experimental de animales con lesión moderada. Por último, el tercer conjunto de datos fue asignado al grupo de lesión grave, por tratarse de aquellos animales que obtuvieron una mayor puntuación en la Escala de valoración neurológica.

El estudio del diagrama de frecuencia de los datos correspondientes al Tiempo de permanencia en zona interior (Figura 1) obtenidos a través del Smart reveló una tendencia de los datos a agruparse también en tres conjuntos, aunque los tres niveles fueron algo menos claros que en el caso de la Escala de valoración neurológica. El primer conjunto corresponde a los animales que pasaron menos de 4 segundos en la zona interior del cubículo de estudio y concentra un total de 6 ratas. El segundo conjunto de datos va de 4 a 15 segundos transcurridos dentro de la zona de estudio y abarca un total de 35 ratas. Por último, el tercer conjunto de datos corresponde a aquellos animales que pasaron más de 15 segundos en la zona interior del área de estudio, siendo 9 ratas en total. Como en el caso de la Escala de valoración, se asignó cada conjunto a un nivel de lesión. El primero, el correspondiente a los animales que pasaron menos tiempo en la zona interior, fue asignado al grupo de animales con lesión leve. Los animales del segundo conjunto de datos se asignaron al grupo de animales con lesión moderada. Por último, el tercer conjunto, que comprende los animales que pasaron más tiempo en la zona de estudio, fue asignado al grupo de lesión grave.

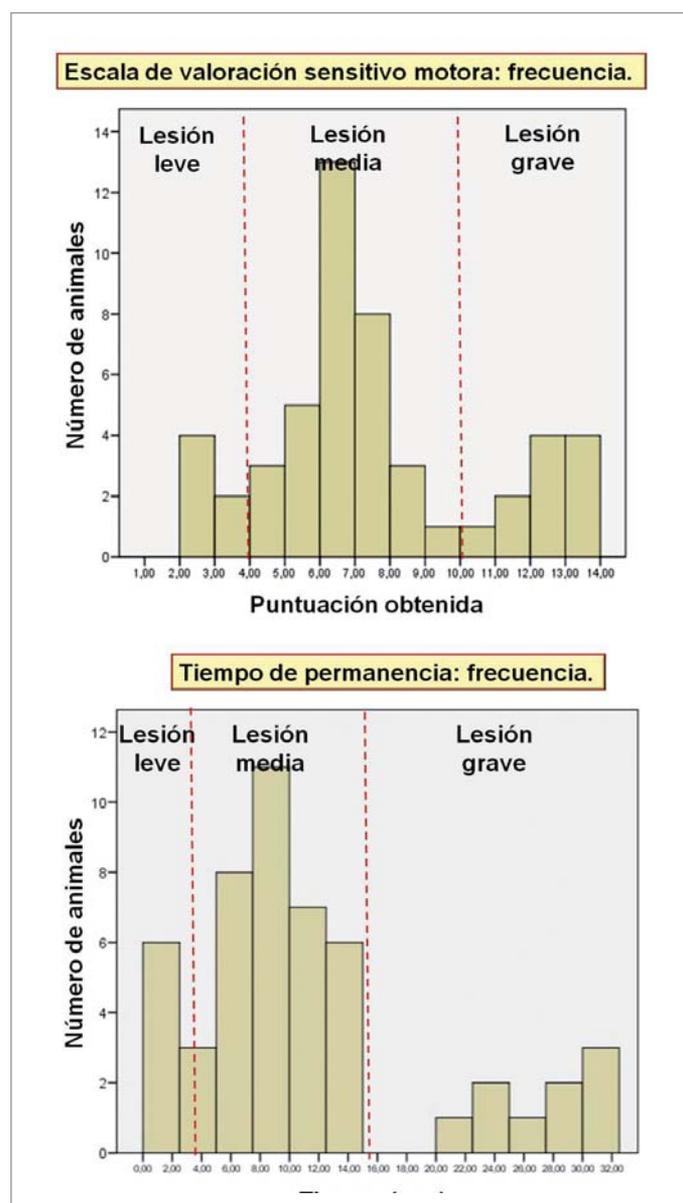


Fig. 1. Diagramas de frecuencia a partir de los cuales se establecen los conjuntos de datos que definen diferentes niveles de lesión en A, Escala de valoración sensitivo-motora, y en B, Tiempo de permanencia en la zona interior.

Asignación del nivel de déficit neurológico y grupos experimentales

Debido a que hay animales que obtienen un nivel de lesión diferente según el test de valoración utilizado (Escala de valoración sensitivo-motora o Tiempo de permanencia en la zona interior del cubículo de estudio), se establecen una serie de criterios de asignación del nivel de deterioro neurológico (lesión leve, lesión moderada y lesión grave), para animales de experimentación con un daño cerebral traumático adquirido, tal como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 1. Criterios para definir el nivel de gravedad de una lesión tras un trauma cerebral en ratas, teniendo en cuenta los datos obtenidos en la Escala de valoración sensitivo-motora y el Tiempo de permanencia en la zona interior; y el número de animales que se encuentra en cada nivel. Establecimiento del número de animales derivado a cada tratamiento dentro de su nivel de lesión correspondiente.

Grupos experimentales	Escala	Tiempo	Número animales	Animales derivados	
Lesión leve	< 4	< 4	N=6	Animales retirados del estudio	Animales con clasificación de lesión leve en ambos tests.
Lesión moderada o media	4-10	4-15	N=29	Grupo 1 CMM n=14 Grupo 2 Control n=15	Animales con clasificación de lesión media al menos en uno de los tests, siendo el otro clasificación leve.
Lesión grave	> 10	> 15	N=15	Grupo 3 CMM n=6 Grupo 4 Control n=9	Animales con clasificación de lesión grave en al menos uno de los tests.

Los animales con lesión leve en ambos estudios muestran poco déficit neurológico. Se determinó que dichos animales (6 en total) se retiraran del estudio, puesto que su seguimiento a largo plazo podría artefactar en gran medida el estudio comparativo de la eficacia de la terapia celular. Para establecer el criterio de los animales que deberían ser considerados como de lesión moderada, se determinó que al menos en uno de los tests debían estar en dicha categoría (29 animales), ya que aquellos animales que obtuvieron una clasificación de lesión grave en cualquiera de los tests fueron asignados inmediatamente a la categoría de lesión grave (15 animales). Dicha clasificación se determinó teniendo en cuenta que si su incapacidad de orientación (Tiempo de permanencia en la zona interior) o su déficit motor y sensorial (Escala de valoración) lo han llevado a ser considerado como lesión grave en cualquiera de los dos tests es porque su lesión cerebral es mayor que la de un animal que obtuvo la clasificación de lesión moderada en ambos tests.

Para establecer los grupos experimentales se derivó de forma aleatoria, dentro de cada nivel de lesión, aproximadamente el 50% de los animales al grupo de tratamiento con CMM, mientras que el otro 50% fue al grupo de animales control. Así, los grupos experimentales quedaron configurados de la siguiente forma (Tabla 1): animales con lesión leve (N=6), que se retiraron del estudio; animales con lesión moderada (N=29), del grupo 1 (N=14, 50% de los animales con lesión moderada), con trasplante intralesional de 5 millones de CMM, y del grupo 2 (N=15, 50% de los animales con lesión moderada), con trasplante intralesional de suero fisiológico; y animales con lesión grave (N=15), del grupo 3 (N=6, 50% de los animales con lesión grave), con trasplante intralesional de 5 millones de CMM, y del

grupo 4 (N=9, 50% de los animales con lesión grave), con trasplante intralesional de suero fisiológico.

Valoración neurológica

Transcurridos dos meses desde los tratamientos (cuatro meses desde el trauma cerebral), se obtuvieron resultados de los dos métodos de valoración de los cuatro grupos experimentales anteriormente definidos. En la escala de valoración sensitivo-motora (Tabla 1), se puede observar que la evolución de los animales con una lesión severa tratados con CMM muestra un patrón muy similar con respecto a sus controles, donde estadísticamente no se obtienen diferencias significativas ($p \geq 0.05$) en ninguno de los puntos del estudio. Sin embargo, en los animales con una lesión moderada, sí se obtienen diferencias estadísticamente significativas en las semanas 6 y 8 tras la administración de los tratamientos entre el grupo tratado con CMM y el grupo control ($p < 0.05$).

Al analizar las imágenes captadas a través del Smart (tiempo de permanencia de los animales en la zona interior del cubículo) (Tabla 1), se observa que la evolución de los animales con lesión severa tratados con células y sus controles es muy similar, no detectándose diferencias significativas ($p \geq 0.05$). Al comparar estadísticamente el tiempo que los animales permanecen en el interior del cubículo de los animales con lesión moderada, sí se detectan diferencias significativas en la semana 8 entre el grupo tratado con células y el grupo control ($p < 0.05$).

Estudios macroscópicos de la zona de lesión

Al finalizar el estudio, y tras eutanasiar a los animales, se realiza el estudio macroscópico de la zona de lesión con el fin de intentar comprobar posibles cambios a nivel histoló-

gico asociados a la terapia celular y al nivel de lesión cerebral. En los grupos de lesión media y de lesión grave (tanto en los animales tratados con CMM como con suero) se observó una gran contusión sobre la corteza parietal que se extiende ventralmente formando una profunda cavidad (Tabla 1) (Figura 1) (Figura 2) (Figura 3).

En el estudio cualitativo realizado sobre las preparaciones controles teñidas con hematoxilina-eosina se observó una gran superficie de tejido que mostraba ausencia total o parcial de la arquitectura normal de la superficie cortical cerebral, tanto en los niveles de lesión media como grave (Figura 1) (Figura 2) (Figura 3). No se detectaron diferencias evidentes en la arquitectura tisular entre los niveles lesión media y lesión grave, ni entre los animales tratados con CMM o los controles, aunque cualitativamente se observó un mayor número de macrófagos en los grupos controles de ambos niveles de lesión (Figura 3).

Los estudios histológicos de la zona de lesión también mostraron que aquellos animales con una lesión grave parecían tener un volumen de lesión ligeramente mayor que

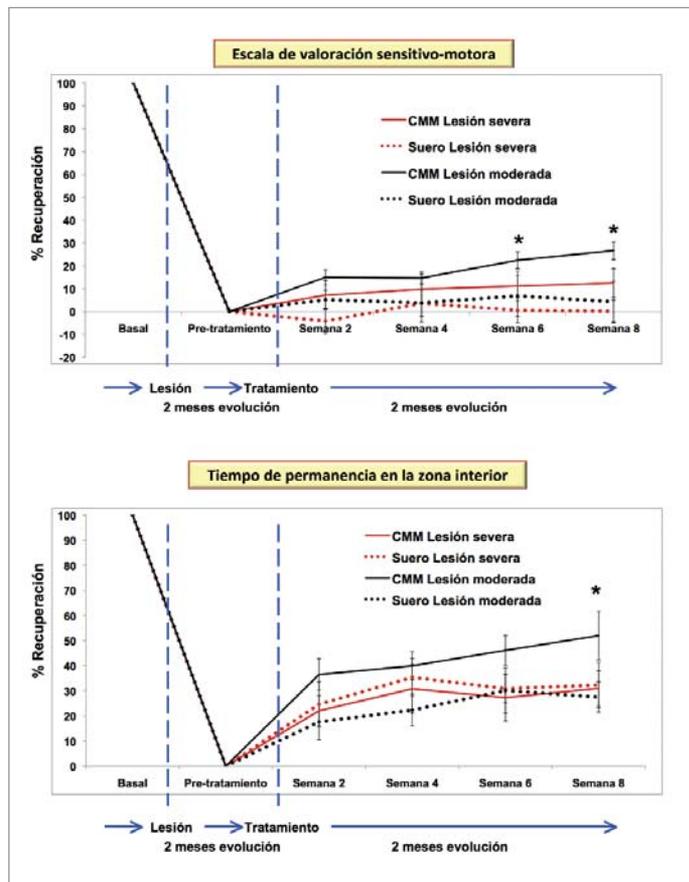


Fig. 2. Escala de valoración sensitivo-motora y tiempo de permanencia en zona interior.

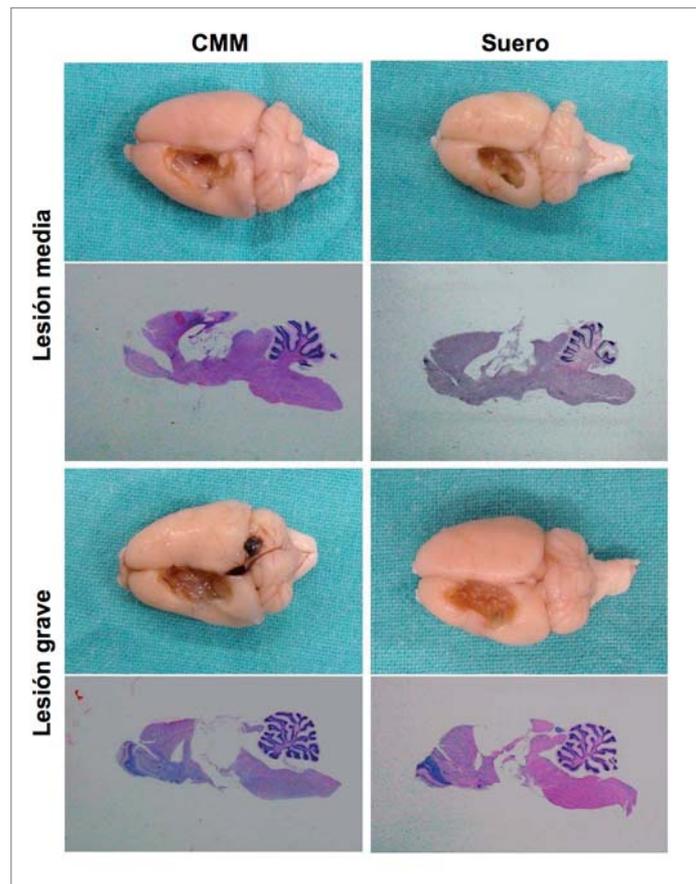


Fig. 3. Estudio necroscópico de las muestras obtenidas donde se muestran ejemplos de cerebros de cada uno de los niveles de lesión donde se observa la cavidad posttraumática (1A, 2A, 3A y 4A) y ejemplos de los cortes histológicos estudiados (1B, 2B, 3B y 4B).

los animales con una lesión moderada, a los dos meses tras los tratamientos y cuatro meses tras la lesión cerebral traumática (Figura 3), pero esta diferencia no se consideró estadísticamente significativa.

Discusión

El trauma cerebral es actualmente la principal causa de muerte y discapacidad en personas menores de 25 años de edad [1][14-16]. Una vez que se ha estabilizado el daño cerebral, no hay terapias efectivas para intentar recuperar la función neurológica, salvo la rehabilitación y algunos cuidados básicos paliativos [17-19]. La característica más prevalente en los supervivientes de un TCE son los déficits cognitivos y la disfunción motora, y dichos déficits son los que se valoraron en nuestro modelo de lesión cerebral. El desarrollo de tratamientos efectivos para tratar a estos pacientes es una línea terapéutica prometedora con un gran potencial clínico y de ahorro económico.

En un esfuerzo por intentar trasladar los resultados obtenidos con los estudios realizados en modelos experimentales de TCE a lo que sucede en la clínica humana, nos propusimos estudiar si la gravedad y magnitud de los déficits neurológicos permanentes resultantes de un trauma cerebral pueden influir en la posible eficacia de las terapias celulares, actualmente en su fase inicial de aplicación clínica.

No existen estudios que establezcan niveles de déficit neurológico en ratas con una lesión cerebral crónica. Para ello, intentamos diseñar una escala de clasificación de diferentes niveles de déficit neurológico en un modelo experimental de lesión cerebral traumática previamente diseñado y desarrollado en ratas Wistar adultas. Existen estudios que describen diferentes niveles de gravedad del trauma cerebral a través del uso del test NSS en un modelo de ratón, comenzando las valoraciones neurológicas una hora post-trauma [20]. Más recientemente se utilizó la misma clasificación para estudiar diferentes secuelas asociadas con el daño cerebral traumático [21]. La valoración neurológica desarrollada mostró que la gravedad de la lesión cerebral aumenta dependiendo de la magnitud del impacto cerebral recibido. En nuestro estudio hemos podido encontrar diferentes déficits funcionales con una misma intensidad de lesión estandarizada, lo que creemos similar a lo que ocurre en clínica, donde la intensidad de las secuelas postraumáticas es muy variable, aunque la intensidad del daño aplicado sea similar, ya que en ello influyen lesiones secundarias derivadas del daño vascular que puede asociarse o no al daño traumático primario. La evolución del daño cerebral puede ser dependiente de la microestructura tisular y vascular que son propias de cada animal, no siguiendo un patrón común en todos los animales y siendo dependiente del estado fisiológico de los mismos.

Otra variable a tener en cuenta relacionada con la clasificación otorgada es la valoración neurológica. Para el desarrollo de este trabajo se ha utilizado una Escala de valoración sensitivo-motora de 19 puntos y un sistema de análisis de imágenes de vídeo (VTB test), con el fin de valorar al máximo los aspectos relacionados con los déficits permanentes establecidos con el modelo de lesión cerebral utilizado. La clasificación de los diferentes niveles de lesión cerebral descrita anteriormente utiliza una escala de 10 puntos en un modelo de lesión cerebral en ratones. En este trabajo se utilizó una escala de valoración de 19 puntos, y posiblemente al incluir más aspectos dentro de los puntos de estudio se representa una mejor valoración de los déficits neurológicos adquiridos tras realizar la lesión cerebral experimental. Finalmente, se establecieron tres niveles de déficit neurológico: lesión leve, lesión media y lesión grave.

Prácticamente no existen evidencias experimentales del efecto de la terapia celular en animales con lesiones establecidas tras sufrir un daño traumático cerebral. En los escasos datos de los que se dispone no se han detectado diferencias significativas sobre la recuperación motora o cognitiva tras el tratamiento con neuronas NT2N trasplantadas esteotóxicamente en la zona perilesional, en un modelo de trauma cerebral crónico en ratas [22]. Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos logrado revertir los déficits neurológicos tras el trasplante intralesional de CMM dos meses después de la realización de un trauma cerebral experimental [10]. Actualmente no hay publicado ningún trabajo en el que se estudie el potencial terapéutico de las CMM cuando estas son administradas en función de la intensidad de las secuelas neurológicas.

En el presente estudio se ha llevado a cabo la administración tardía de CMM en diferentes niveles de lesión cerebral. El tratamiento con CMM utilizado muestra diferentes resultados en la eficacia de la terapia celular dependiendo de la gravedad del daño cerebral permanente. En el grupo de lesión grave, los animales que recibieron el tratamiento control con suero y los animales que recibieron el tratamiento con CMM mostraron una evolución neurológica similar, donde no se detectó ningún tipo de mejoría. En el grupo de lesión media, los animales que recibieron la administración intracerebral de CMM mostraron una recuperación progresiva y evidente de sus déficits neurológicos en comparación con los animales de lesión media que recibieron el tratamiento control con suero salino, comenzándose a detectar las mejoras pocas semanas después del tratamiento.

Los resultados obtenidos sugieren por primera vez que existe una relación entre el nivel de gravedad de la lesión cerebral y la efectividad de la terapia celular con CMM del estroma de médula ósea en el tratamiento de las secuelas permanentes tras sufrir un daño cerebral traumático. Posiblemente la diferencia en la eficacia de la terapia celular dependiendo del nivel de déficit permanente esté relacionada con la propia fisiopatología de la lesión traumática cerebral.

En el estudio histológico desarrollado en el presente trabajo no se han detectado diferencias entre los grupos de lesión media y de lesión grave, ni entre los grupos que recibieron suero fisiológico o CMM, posiblemente porque las mejoras en la función neurológica obtenidas tras la realización de los tratamientos en el grupo de lesión media implican más de un mecanismo. Las CMM son conocidas por segregar varios factores de crecimiento [2][23-25], los cuales son también conocidos por promover la recuperación funcional tras un daño, amplificando así los niveles cerebrales endógenos. Las CMM también inducen a las propias

células del parénquima cerebral a producir esos factores tróficos [25] e influyen sobre varias funciones reparadoras del propio tejido neural, como son sinaptogénesis, angiogénesis [26] y neurogénesis [10][27]. Así, parece obvio que existen diversos mecanismos de recuperación, los cuales pueden jugar un importante papel tras el trasplante, incluyendo mecanismos capaces de restaurar las funciones neurológicas previamente suprimidas [28].

Un aspecto importante a considerar en el presente trabajo es que no se detectó una disminución del tamaño de la lesión, lo que sugiere que el trasplante de CMM por sí solo no afecta a la reducción de las cavidades cerebrales post-traumáticas. Si se pudiese aumentar la supervivencia e integración de las células trasplantadas en el tejido cerebral dañado, posiblemente se favorecería la disminución de las cavidades post-traumáticas, lo cual favorecería en mayor medida la recuperación de la función neurológica independientemente de la gravedad de la lesión, potenciándose al máximo la efectividad de la terapia celular [29]. En esta nueva línea de investigación es donde se están centrando los nuevos estudios, ya que se trata de encontrar un nuevo mecanismo para realizar la terapia celular donde se aumente la viabilidad de las células y donde, a su vez, se potencien al máximo las cualidades que pueda aportar esta nueva forma de terapia.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se amplían los conocimientos que tenemos acerca de la eficacia y utilidad de la terapia celular para tratar las lesiones cerebrales crónicas, y aunque la aplicación de estas técnicas en pacientes está comenzando, parece obvio que aún no tenemos el conocimiento necesario acerca de la fisiopatología del TCE y de cómo la terapia celular puede actuar, así como de qué forma podemos optimizar los buenos resultados obtenidos hasta la fecha. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J Head Trauma Rehabil* 2006; 21:375-8.
- Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol* 2002; 1: 92-100.
- Hofstetter CP, Schwartz EJ, Hess D, Widnfolk J, El Manira A, Prockop DJ, Olson L. Marrow stromal cells from guiding strans in the injured spinal cord and promote recovery *PNAS USA* 2002; 99:2199-204.
- Ankeny DP, Mc Tighe DM, Jakeman LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 2004; 190:17-31.
- Zurita M, Vaquero J, Bonilla C, Santos M, De Haro J, Oya S, *et al.* Functional recovery of chronic paraplegic pigs after autologous transplantation of bone marrow stromal cells. *Transplantation* 2008; 86:845-53.
- Li Y, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury. *Neurosci Lett.* 2009; 456:120-3.
- 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.
- 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.
- Mahmood A, Lu D, Wang L, Chopp M. Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2002; 19:1609-17.
- Bonilla C, Zurita M, Otero L, Aguayo C, Vaquero J. Delayed intralesional transplantation of bone marrow stromal cells increases endogenous neurogenesis and promotes functional recovery after severe traumatic brain injury. *Brain Inj* 2009; 23:760-9.
- Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, Chopp M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci* 2001; 189:49-57.
- Otero L, Zurita M, Aguayo C, Bonilla C, Rodríguez A, Vaquero J. Video-Tracking-Box linked to Smart software as a tool for evaluation of locomotor activity and orientation in brain-injured rats. *J Neurosci Methods* 2010; 188:53-7.
- Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Rodríguez A, Zurita M, Vaquero J. Terapia celular para el tratamiento del daño cerebral traumático: Utilidad de diferentes escalas de valoración funcional. *Trauma Fund Mapfre* 2009; 20: 234-42.
- Thurman D, Guerrero J. Trends in hospitalization associated with traumatic brain injury. *JAMA* 1999; 282:954-957.
- Bruns J Jr, Hauser WA. The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia* 2003; 44:2-10.
- Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien)* 2006; 148:255-68.
- Narayan RK, Michel ME, Ansell B, Baethmann A, Biegon A, Bracken MB, *et al.* Clinical trials in head injury. *J Neurotrauma* 2002; 19:503-57.

18. Royo NC, Shimizu S, Schouten JW, Stover JF, McIntosh TK. Pharmacology of traumatic brain injury. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3:27–32.
19. Beauchamp K, Mutlak H, Smith WR, Shohami E, Stahel PF. Pharmacology of traumatic brain injury: where is the «golden bullet»? *Mol Med* 2008; 14:731–40.
20. Tsenter J, Beni-Adani L, Assaf Y, Alexandrovich AG, Trembovler V, Shohami E. Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities, and motor and cognitive functions. *J Neurotrauma* 2008; 25:324–33.
21. Schwarzbald ML, Rial D, De Bem T, Machado DG, Cunha MP, dos Santos AA, et al. Effects of traumatic brain injury of different severities on emotional, cognitive, and oxidative stress-related parameters in mice. *J Neurotrauma* 2010; 27:1883–93.
22. Zhang C, Saatman K, Royo NC, Soltesz KM, Millard M, Schouten J et al. Delayed transplantation of human neurons following brain injury in rats: a long-term graft survival and behavior study. *J Neurotrauma* 2005; 22:1456–74.
23. Chen X, Katakowski M, Li Y, Lu D, Wang L, Zhang L et al. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production. *J Neurosci Res* 2002; 69:687–91.
24. Yoshimura S, Teramoto T, Whalen MJ, Irizarry MC, Takagi Y, Qiu J et al. FGF-2 regulates neurogenesis and degeneration in the dentate gyrus after traumatic brain injury in mice. *J Clin Invest* 2003; 112:1202–10.
25. 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.
26. 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.
27. Chen J, Chopp M. Neurorestorative treatment of stroke: cell and pharmacological approaches. *NeuroRx* 2006; 3:466–73.
28. Vaquero J, Zurita M. Bone marrow stromal cells for spinal cord repair: A challenge for contemporary neurobiology. *Histol Histopathol* 2009; 24:107–16.
29. Vaquero J, Zurita M. Functional recovery after severe CNS trauma: Current perspectives for cell therapy with bone marrow stromal cells. *Prog Neurobiol* 2011; 93:341-9.

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.