

INVESTIGACIÓN

2009

EFFECTO DEL TRASPLANTE DE CÉLULAS GLIALES SOBRE EL DÉFICIT EN LA HABILIDAD MOTORA FINA PRODUCIDO POR LA LESIÓN DE LA CORTEZA FRONTAL EN RATAS ADULTAS

FUNDACIÓN MAPFRE

www.fundacionmapfre.com

Investigador Principal

Margarita Heredia Chons

Dra. en Biología.
Profesora Dpto. de Fisiología y Farmacología. Facultad de Medicina.
Universidad de Salamanca

Equipo Investigador

Adelaida Sánchez Riobos

Dra. en Biología.
Profesora Dpto. de Fisiología y Farmacología. Facultad de Medicina.
Universidad de Salamanca

Antonio de la Fuente Juan

Profesor Dpto. de Fisiología y Farmacología. Facultad de Medicina.
Universidad de Salamanca

José María Criado Gutiérrez

Dr. en medicina y Cirugía.
Profesor Dpto. de Fisiología y Farmacología. Facultad de Medicina.
Universidad de Salamanca

Lydia Jiménez Díaz

Dra. en Farmacia.
Investigadora postdoctoral Juan de la Cierva.
Universidad de Salamanca

Índice

	Página
1. RESUMEN DE PROYECTO	4
2. DESARROLLO DEL PROYECTO	4
2.1. Fase preoperatoria	4
2.2. Fase de lesión	5
2.3. Fase comportamental post-lesión	6
2.4. Trasplantes	6
2.5. Fase comportamental post-trasplante	7
2.6. Estudios inmunocitoquímicos e histológicos	8
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	8
3.1. Resultados comportamentales	8
3.2. Resultados histológicos e inmunocitoquímicos	10
4. CONCLUSIONES	12
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
6. DIFUSIÓN DE RESULTADOS	12

1. RESUMEN DE PROYECTO

El objetivo del presente proyecto ha sido investigar si trasplantes de células gliales (astrocitos) son capaces 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 nueva tecnología de encapsulación de células, la cual tiene como objetivo el tratamiento de múltiples enfermedades incluidas las del Sistema Nervioso Central (SNC) sin necesidad de aplicar inmunosupresión (Orive y col. 2003). En esta técnica, las células son inmovilizadas en el interior de cápsulas de una matriz polimérica biocompatible. Para nuestro estudio, hemos elegido como matriz polimérica, el alginato, un polímero biocompatible ampliamente estudiado para su aplicación con fines médicos (Orive y col. 2005). Para el desarrollo del presente proyecto se han utilizado pruebas conductuales, cultivos celulares, técnica de encapsulación de células en alginato, trasplantes y métodos inmunocitoquímicos e histológicos. Los animales se condicionaron en un test conductual de habilidad motora fina y se determinó su mano preferente. A continuación, se realizó una lesión en la corteza frontal contralateral a la mano preferente y se evaluó la efectividad de la lesión mediante el test de conducta. Posteriormente, en un grupo de animales lesionados se trasplantó en la cavidad producida por la lesión, células gliales (astrocitos) encapsuladas en esferas de alginato; en un segundo grupo, se utilizó tejido cortical embrionario como tejido donante; y en un tercer grupo se trasplantó esferas de alginato sin astrocitos. Estos tres grupos se compararon con un grupo de animales controles. A los 90 días post-trasplante, tanto los animales con trasplantes de tejido cortical como aquellos con trasplantes de astrocitos encapsulados en esferas de alginato mejoraron notablemente el déficit motor inducido por la lesión. Por el contrario, los animales con trasplantes de cápsulas de alginato sin astrocitos no presentaron mejoría.

2. DESARROLLO DEL PROYECTO

Para la realización del proyecto hemos realizado una serie experimental de ratas macho, de cepa Wistar, de acuerdo al diseño experimental propuesto, que constó de las siguientes fases: 1) Fase preoperatoria; 2) Lesión de la corteza frontal; 3) Fase conductual post-lesión; 4) Trasplante; 5) Fase conductual post-trasplante; y 6) Estudios inmunocitoquímicos e histológicos.

2.1. Fase preoperatoria

Tras la recepción de los animales, se realizó la adaptación de los animales a las condiciones del estabulario

de nuestro laboratorio durante 7 días. A continuación, los animales fueron separados en jaulas individuales y pesados, considerando dicho peso como el 100% del peso inicial *ad libitum*. 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 y otros Fines Científicos, reduciéndose al máximo el número de animales utilizados para el desarrollo del presente estudio.

En esta primera fase del diseño experimental, los animales se condicionaron en el test de habilidad motora fina. En este test, el animal es condicionado para ejecutar movimientos de gran precisión motora de extensión y flexión de los dígitos con el fin de obtener comida. Para la realización del test, los animales fueron privados de comida hasta alcanzar el 86-88% de su peso *ad libitum*, con el fin de motivar a los animales para la ejecución de la prueba. El control del peso se realizó pesando a los animales diariamente y administrándoles la comida según el valor del peso de cada día. Para realizar la prueba de conducta, el sujeto experimental se situó en la caja de test en sesiones individuales de 3 minutos de duración. Cuando el animal accedió a la bandeja que contenía los pellets de pienso, siempre lo hizo con una única mano, lo que permitió determinar la mano preferente del animal.

CAJA DE TEST

El test de habilidad motora fina se realizó en una habitación aislada de ruidos y en condiciones de semioscuridad, con un solo foco orientado indirectamente hacia la caja de test, para asegurar la atención del animal en la prueba. Este test de conducta ha sido utilizado en diversos estudios de nuestro laboratorio y la caja de test descrita con detalle (Riobos y cols. 2001, Heredia y cols. 2009). Brevemente, la caja de test consiste en una caja de metacrilato con el suelo de barras metálicas, separadas entre sí por una distancia de 12 mm, y a una distancia de 2,5 cm del fondo de la caja. Todas sus paredes están pintadas de negro mate, excepto la pared frontal que es de metacrilato transparente con el objeto de que el animal pueda ser observado por el experimentador. La pared frontal tiene tres agujeros de 2 cm. de diámetro cada uno y separados entre sí 5 cm. Perpendicular a la pared frontal, y separada de ella 1 cm, se sitúa una bandeja, con una hendidura central, donde se colocan los pellets de pienso, estandarizados, de 1 mg de peso (Fig. 1). Si el animal quiere consumir comida, tiene que acceder a la bandeja de pellets de pienso, a través de uno de los agujeros de la pared frontal, solamente con una de las manos delanteras (derecha o izquierda) ya que ambas manos no caben a la vez por los agujeros.

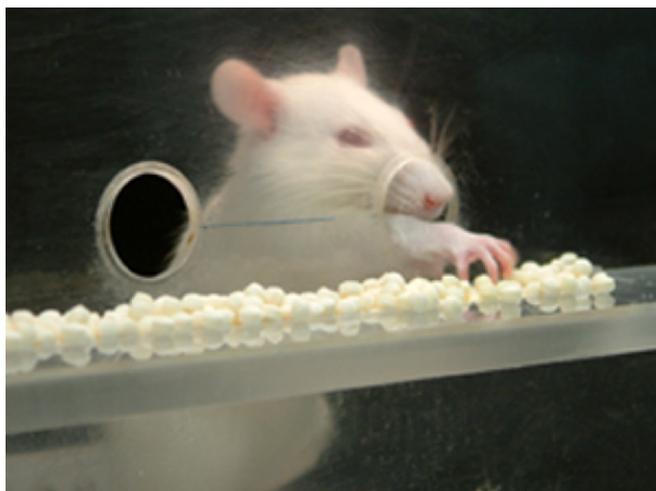


Figura 1. Fotografía de una rata en la caja de test durante la realización de una respuesta, en la que el animal está introduciendo una de sus manos por un agujero de la pared frontal con el fin de coger un pellet de pienso. Se puede apreciar la disposición de los agujeros de la pared frontal y la posición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

Parámetros evaluados en el test de comportamiento

Durante la prueba de comportamiento, fueron evaluados dos parámetros:

Número total de respuestas: Suma de respuestas correctas e incorrectas realizadas con ambas manos.

Porcentaje de respuestas correctas sobre el número total de respuestas: Porcentaje de respuestas correctas realizadas con la mano preferente con respecto al número total de respuestas realizadas con ambas manos.

Para comprender los parámetros evaluados durante el test de comportamiento, a continuación se define lo que se consideró una respuesta correcta y una respuesta incorrecta durante la ejecución de la prueba.

Respuesta correcta: Se consideró una respuesta correcta cuando el animal realizó una secuencia comportamental adecuada en la caja de test para obtener alimento. Es decir, el animal tenía que acceder a la bandeja de pellets de pienso a través de uno de los agujeros de la pared frontal, solamente con una de las manos delanteras (derecha o izquierda), tocar el pellet, flexionar los dígitos cogiendo el pellet, introducir la mano con el pellet en la caja de test y llevarse el pellet a la boca.

Respuesta Incorrecta: Se consideró una respuesta incorrecta cuando el animal falló en alguno de los actos de la secuencia comportamental, descrita anteriormente. Es decir, aquella en la que el animal accede a la bandeja de pellets de pienso a través de uno de los agujeros de la pared frontal, toca el pellet, no flexiona bien los dígitos y lo arrastra, por lo tanto el pellet cae en el hueco entre la bandeja y la pared frontal y el animal ya no puede acceder a él; o bien, el animal accede a la bandeja, toca el pellet, flexiona los dígitos cogiendo el pellet, pero no lo lleva adecuadamente a la boca, sino que el pellet cae al fondo

de la caja y el animal ya no lo puede recuperar para comérselo.

En esta fase preoperatoria se determinó la mano preferente del animal (derecha o izquierda). Se consideró la mano preferente aquella con la que el animal efectuó al menos el 80% del total de respuestas correctas.

Se estimó que un animal estaba condicionado cuando el porcentaje de respuestas correctas fue del 60%, durante 3 sesiones consecutivas. El tiempo medio aproximado para alcanzar el criterio de condicionamiento fue de 10 días. Los valores del número total de respuestas y del porcentaje de respuestas correctas, obtenidos en el test de habilidad motora fina, se utilizaron para la distribución de los animales en los distintos grupos, de tal forma que no hubiera diferencias significativas entre los grupos, tanto respecto a la media del número total de respuestas como al porcentaje de respuestas correctas.

2.2. Fase de lesión

Una vez completada la fase preoperatoria, los animales se distribuyeron en dos grupos, un grupo que fue lesionado en el área de la corteza motora correspondiente a la mano anterior, de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas establecidas por Neafsey y colaboradores (1986) para dicha zona, y un grupo control. El grupo control fue sometido al mismo procedimiento quirúrgico que el grupo lesionado, exceptuando la lesión propiamente dicha. Las lesiones se realizaron por aspiración de la corteza motora contralateral a la mano preferente del animal. El objetivo de esta fase fue lesionar la zona de la corteza motora que controla los movimientos de extensión y flexión de los dígitos, necesario para la ejecución del test de habilidad motora fina utilizado en el presente estudio.

Todos los animales permanecieron en ayunas 24 horas antes de la intervención quirúrgica y fueron anestesiados profundamente con Equitesina (1ml/250 gr de peso corporal) antes de ser lesionados.

Para la fijación del cráneo de la rata se utilizó un aparato estereotáxico que permitió, mediante el movimiento de un manipulador en los tres ejes del espacio, la localización exacta de las coordenadas. Las coordenadas 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.

Una vez que el animal estuvo profundamente anestesiado, se fijó en el aparato estereotáxico, situando los incisivos 5 mm por encima de la línea interaural. Para poder llevar a cabo el proceso de lesión con la máxima precisión, se utilizó una lupa quirúrgica Zeiss con aumentos y luz regulables. Finalizado el proceso quirúrgico, cada animal fue colocado de nuevo en su jaula sobre una lámina de papel de filtro para evitar la obstrucción de las vías respiratorias por la aspiración del polvo de las virutas de serrín, y se mantuvo bajo vigilancia para controlar la pérdida de calor corporal hasta la recuperación total de la actividad, momento en el cual se le suministró agua.

Al día siguiente, una vez que se comprobó que el animal estaba en perfecto estado y que el tránsito intestinal, controlado por las defecaciones, era correcto, se procedió a suministrarle comida.

2.3. Fase comportamental post-lesión

Una vez recuperados de la operación quirúrgica, todos los animales fueron ensayados de nuevo en el test de habilidad motora fina para comprobar la efectividad de la lesión. Todos los animales se pesaron y se restringió el suministro de alimento para mantener nuevamente su peso en el 84-86% del peso *ad libitum*.

El test conductual se aplicó durante 3 días consecutivos como máximo. Se consideró que la lesión había sido efectiva cuando el animal cambió de mano, pasando a utilizar su mano no preferente para obtener la comida, o bien redujo el porcentaje de respuestas correctas al menos en un 30% comparado con su valor en la fase preoperatoria.

Los animales que durante el test de habilidad motora fina no mostraron lesiones efectivas, fueron sometidos a una nueva intervención quirúrgica, para comprobar el tamaño de la lesión efectuada, aumentando su tamaño en los casos en que fue necesario.

Una vez que los animales finalizaron esta fase, fueron alimentados *ad libitum*. Cuando recuperaron su peso se procedió a estabularlos por parejas y a realizar los trasplantes.

Sólo los animales en los que se comprobó mediante el test de habilidad motora fina que la lesión había sido efectiva pasaron a la fase de trasplante.

2.4. Trasplantes

Tanto los animales que iban a ser trasplantados (huéspedes) como los animales controles permanecieron en ayunas 24 horas antes de la intervención quirúrgica. Todos los animales fueron anestesiados profundamente antes de ser trasplantados.

En un grupo de animales, se trasplantó tejido cortical embrionario en la cavidad de la corteza motora de los animales huéspedes (trasplantes homotópicos); en un segundo grupo, se realizaron trasplantes de astrocitos encapsulados en esferas de alginato; y en un tercer grupo, se utilizaron trasplantes de esferas de alginato sin astrocitos como tejido donante.

Trasplantes de tejido cortical embrionario: Para estos trasplantes se utilizó tejido cortical frontal procedente de embriones de 16 días de desarrollo embrionario (E16). Los trasplantes realizados fueron trasplantes sólidos que se implantaron en la cavidad producida por la lesión en la corteza motora de los animales huéspedes. Todo el proceso de obtención del tejido donante se realizó en suero glucosado estéril.

La hembra gestante permaneció profundamente anestesiada, a temperatura constante, durante todo el proceso quirúrgico. Se procedió a realizar una incisión en la zona

sub-abdominal, a través de la cual se tuvo acceso a los dos cuernos uterinos donde se localizaban los embriones. Los embriones se extrajeron uno por uno, comenzando por el extremo del cuerno y manteniendo el resto de los embriones dentro del seno materno hasta su utilización. Una vez extraído el embrión, se eliminó la placenta y se procedió a la disección del cerebro con la ayuda de una lupa.

Para la obtención del tejido cortical, se diseccionó el cerebro del embrión y, tras la eliminación de las meninges, se obtuvo de cada hemisferio una pequeña pieza de 2 mm³, aproximadamente, del área cortical frontal incluyendo todo el espesor de la corteza, que se trasplantó en la cavidad producida por la lesión en la corteza motora de los animales huéspedes.

La elección de embriones de E16 se basó en estudios previos de trasplantes corticales que indican que esta edad embrionaria es la óptima para la supervivencia y éxito del trasplante. En la figura 2 se presenta un esquema del área cortical frontal del embrión, seleccionada como tejido donante.

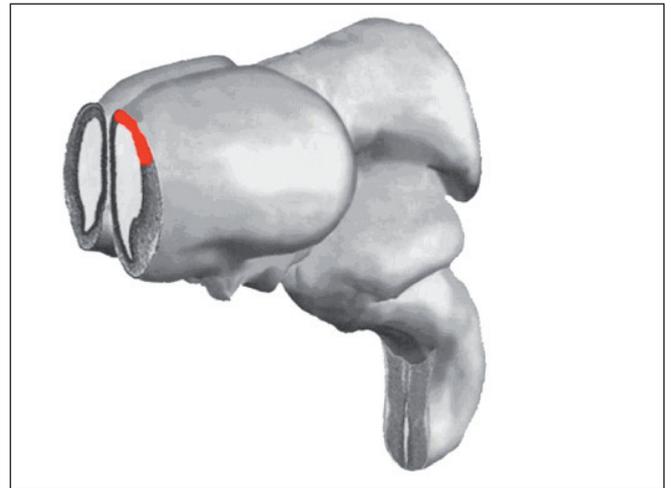


Figura 2. Dibujo tridimensional en el que se detalla (en rojo) la región cortical frontal del cerebro de un embrión de E16 utilizada como tejido donante para los trasplantes homotópicos de tejido cortical (modificada de Altman y Bayer, 1995).

Para la realización de los trasplantes cada uno de los animales huéspedes, profundamente anestesiado, se fijó en el aparato estereotáxico. La preparación del animal huésped se realizó simultáneamente a la obtención del tejido donante, con el fin de evitar el almacenamiento del trasplante en suero glucosado, optimizando así la supervivencia de las células. Así, en el mismo momento en que la cavidad del huésped estuvo preparada para recibir el trasplante, éste se acababa de extraer del embrión y estaba dispuesto para ser introducido en la cavidad de la corteza motora del huésped. En la mayoría de los animales se implantaron 2 piezas de tejido donante. La localización de los trasplantes una vez implantados en la cavidad del huésped, se controló mediante una lupa quirúrgica, asegurando así la posición de los mismos dentro de la cavidad. Una vez colocados los trasplantes en la

cavidad y verificada la posición de éstos, se retiró el líquido sobrante para evitar que el tejido trasplantado pudiera salir de la cavidad. A continuación, se situó un trozo pequeño de espongostán encima de los trasplantes y se suturó la piel.

Trasplantes de astrocitos encapsulados en esferas de alginato: Los trasplantes se obtuvieron a partir de cultivos de astrocitos procedentes del cerebro de ratas recién nacidas (P1) que se encapsularon, posteriormente, en esferas de alginato. Los astrocitos crecieron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) suplementado con un 10% de suero fetal bovino. Los cultivos se sembraron en frascos y se mantuvieron en un incubador a 37°C, con una humedad de 95% - 5%CO₂; cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días (Fig. 3).

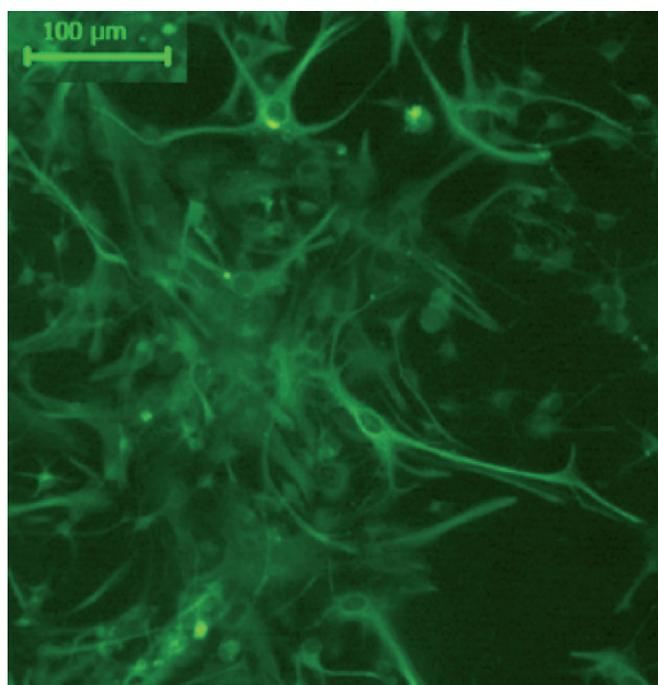


Figura 3. Cultivo de astrocitos procesados inmunocitoquímicamente para la proteína fibrilar ácida (GFAP), utilizando un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína.

Los astrocitos fueron inmobilizados en esferas de alginato ultrapurificado, de baja densidad y alto contenido en ácido glucurónico (alginato-LVG, Novamatrix, Noruega), de 2 mm de diámetro. Para ello, las células fueron suspendidas en una solución estéril de alginato-LVG al 1,5% (p/v), obteniéndose una densidad celular de 2×10^6 células/ml de alginato. Para hacer las esferas, de esta suspensión de astrocitos se cogieron 10 μ l con una micropipeta y se dejaron caer en una solución de gelación de CaCl₂. Este proceso se realizó a temperatura ambiente y en condiciones asépticas. Una vez formadas las esferas se mantuvieron en medio de cultivo completo, a 37°C en el incubador, hasta su implantación en la cavidad del huésped (Fig. 3).

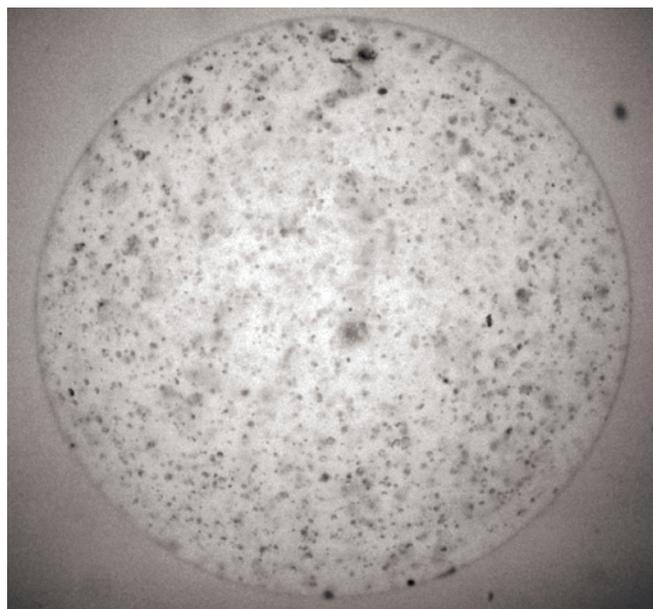


Figura 4. Astrocitos encapsulados en una esfera de alginato.

La preparación del animal huésped y de las esferas de alginato con astrocitos se realizó simultáneamente para evitar el excesivo almacenamiento de las esferas. En la mayoría de los animales se implantaron 2 esferas de alginato con astrocitos en la cavidad de la corteza motora del huésped. La localización de las esferas, una vez trasplantadas, fue controlada, en todo momento del proceso, a través de una lupa quirúrgica, asegurando así la posición de las mismas dentro de la cavidad. Encima de las esferas se situó una pieza pequeña de espongostán y, finalmente, se suturó la piel.

Implantación de esferas de alginato sin astrocitos:

En otro grupo de animales, se implantaron esferas de alginato sin astrocitos, en la cavidad del huésped. El procedimiento de preparación de las esferas fue similar al descrito anteriormente, excepto que no se encapsularon astrocitos en el interior de las esferas.

Tras la realización de los trasplantes, una vez que se comprobó que el animal estaba en perfecto estado y que el tránsito intestinal, controlado por las defecaciones, era correcto, se procedió a suministrarle comida "*ad libitum*". Los animales se mantuvieron en estas condiciones hasta que se iniciaron las pruebas de conducta post-trasplante.

2.5. Fase comportamental post-trasplante

Esta fase conductal se realizó en dos periodos de tiempo, tras la realización de los trasplantes:

1. A corto plazo; esto es a los 20 días de la realización de los trasplantes.
2. A largo plazo, a los 90 días (3 meses) post-trasplante.

1. Corto plazo: Los animales fueron separados en jaulas individuales; se procedió a pesarlos y se restringió la alimentación hasta alcanzar el 84-86% de su peso *ad libitum*. A los 20 días post-trasplante, todos los animales fueron

ensayados en el test de habilidad motora fina durante 3 sesiones, de 3 minutos de duración, en las mismas condiciones que se evaluaron durante las fases preoperatoria y post-lesión; es decir, el animal podía acceder libremente con la mano izquierda o la derecha a los pellets situados en la bandeja de la caja de test (corto plazo, libre acceso). A continuación, se procedió a obligar a los animales a utilizar su mano preferente (mano afectada por la lesión), mediante la colocación de un brazalete en su mano no preferente, el cual impedía que el animal pudiera coger los pellets con dicha mano; así, si el animal quería acceder a la comida, sólo le cabía la posibilidad de utilizar la mano preferente. El brazalete consistió en una pieza gruesa de gasa sujeta a la pata del animal mediante esparadrapo (Fig. 5). El brazalete no le impidió al animal movimientos, como la flexión de los dígitos para apoyar la mano sobre los agujeros de la pared frontal. El brazalete solo se le colocó al animal en el momento de realizar el test conductual. En estas condiciones, los animales se evaluaron durante 3 sesiones individuales de 3 minutos de duración (corto plazo, con brazalete).

Tras la realización de este estudio, se procedió a administrar de nuevo comida *ad libitum* a los animales.

2. Largo plazo: A los tres meses de la realización de los trasplantes, se procedió de nuevo a pesar los animales y se restringió la alimentación hasta alcanzar el 84-86% de su peso *ad libitum*. Posteriormente, todos los animales fueron ensayados de nuevo en el test de habilidad motora fina para valorar el efecto del trasplante sobre el déficit motor causado por la lesión. Los animales fueron evaluados durante 3 sesiones en el test de conducta, con acceso libre a la comida con ambas manos (largo plazo, libre acceso). A continuación, se procedió a forzar a los animales a utilizar su mano preferente (mano afectada por la lesión), mediante la colocación de un brazalete en su mano no preferente. En estas condiciones, los animales se evaluaron durante 9 sesiones individuales de 3 minutos de duración (largo plazo, con brazalete).



Figura 5. Fotografía de un animal con el brazalete colocado en su mano no preferente, para forzar el uso de la mano preferente en el test de habilidad motora fina.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez completados los estudios comportamentales, los resultados se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA). Para las comparaciones de los distintos grupos en la fase post-trasplante, se empleó ANOVA de dos vías (grupo x sesión). Cuando el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$), se procedió a realizar ANOVAs parciales comparando todos los grupos en cada una de las sesiones. Para comparar las medias de cada grupo, en cada una de las sesiones, se utilizó el test de Scheffe.

2.6. Estudios inmunocitoquímicos e histológicos

Estudio inmunocitoquímico de los cultivos de astrocitos: 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 fluoresceína (Fig. 3).

Estudios histológicos: De acuerdo al diseño experimental, una vez completados los estudios conductuales post-trasplante, los animales fueron procesados para el estudio histológico de los cerebros aplicando técnicas histológicas convencionales (tinción con violeta de cresilo para la sustancia de Nissl), para la localización de las lesiones y de los trasplantes. Los animales fueron anestesiados profundamente con Equitesina y a continuación se perfundieron por vía intracardiaca con solución lavadora de dextrano al 2% en Hepes 5 mM, pH 7,3, seguida de paraformaldehído al 4% en Hepes 5 mM, pH 7,3. En el caso de los animales con trasplantes de tejido cortical embrionario se utilizó tampón fosfato 0,1 M, pH 7,3 (PB) en la solución lavadora y en el fijador.

Estudio inmunocitoquímico de los astrocitos encapsulados en las esferas de alginato En algunos animales con trasplantes de astrocitos encapsulados en esferas de alginato se investigó la supervivencia de los astrocitos a largo plazo (10 meses post-trasplante), mediante métodos inmunocitoquímicos para la localización de la GFAP en las esferas. En este sentido, los animales previamente anestesiados con Equitesina, se perfundieron con dextrano al 2% en PB, seguido de paraformaldehído al 4% en PB. Los cerebros fueron diseccionados y se extrajo la esfera/s de la cavidad. A continuación se realizó un frotis de la esfera en un portaobjetos y se fijó con laca durante toda la noche. Al día siguiente, el frotis se fijó con paraformaldehído al 4% en PB y se procesó inmunocitoquímicamente para la GFAP, empleando el método de la avidina-biotina-peroxidasa (sistema ABC).

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Resultados comportamentales

En la figura 6 se representan los resultados de la media del porcentaje de respuestas correctas respecto al nú-

mero total de respuestas con ambas manos, en el test de habilidad motora fina en las fases preoperatoria (PRE), post-lesión (PL) y post-trasplante. En la fase post-trasplante los animales fueron evaluados en dos periodos de tiempo: a corto plazo (a los 20 días de la realización de los trasplantes) y a largo plazo (a los tres meses post-trasplante). En cada periodo de tiempo los animales fueron evaluados en dos condiciones: con acceso libre a la comida con ambas manos (acceso libre) y con el uso obligado de la mano preferente (con brazaletes). Los niveles de significación en la figura son con respecto al grupo control.

Los resultados obtenidos han puesto de relieve que tanto los animales con trasplantes de tejido cortical embrionario como aquellos con trasplantes de astrocitos encapsulados en esferas de alginato presentaron una mejora notable del déficit en la habilidad manual producido por la lesión de la corteza motora. Esta mejora fue evidente a

los tres meses de la realización de los trasplantes y cuando los animales fueron obligados a utilizar la mano afectada por la lesión. Así, en los animales con trasplantes de tejido cortical, el porcentaje de respuestas correctas en el test de habilidad motora fina no presentó diferencias significativas con respecto a los valores de los animales controles, en las 9 sesiones. Los animales con trasplantes de astrocitos encapsulados en esferas de alginato, a partir de la tercera sesión, no presentaron tampoco diferencias significativas en el porcentaje de respuestas correctas con respecto a los animales controles (Fig. 6, largo plazo "con brazaletes"). Por el contrario, los animales con trasplantes de esferas de alginato sin astrocitos no presentaron mejoría del déficit motor. Así, en todas las sesiones, excepto en la tercera, su porcentaje de respuestas correctas en el test de habilidad manual fue muy inferior al de los animales controles siendo las diferencias estadísticamente significativas (Fig. 6, largo plazo "con brazaletes").

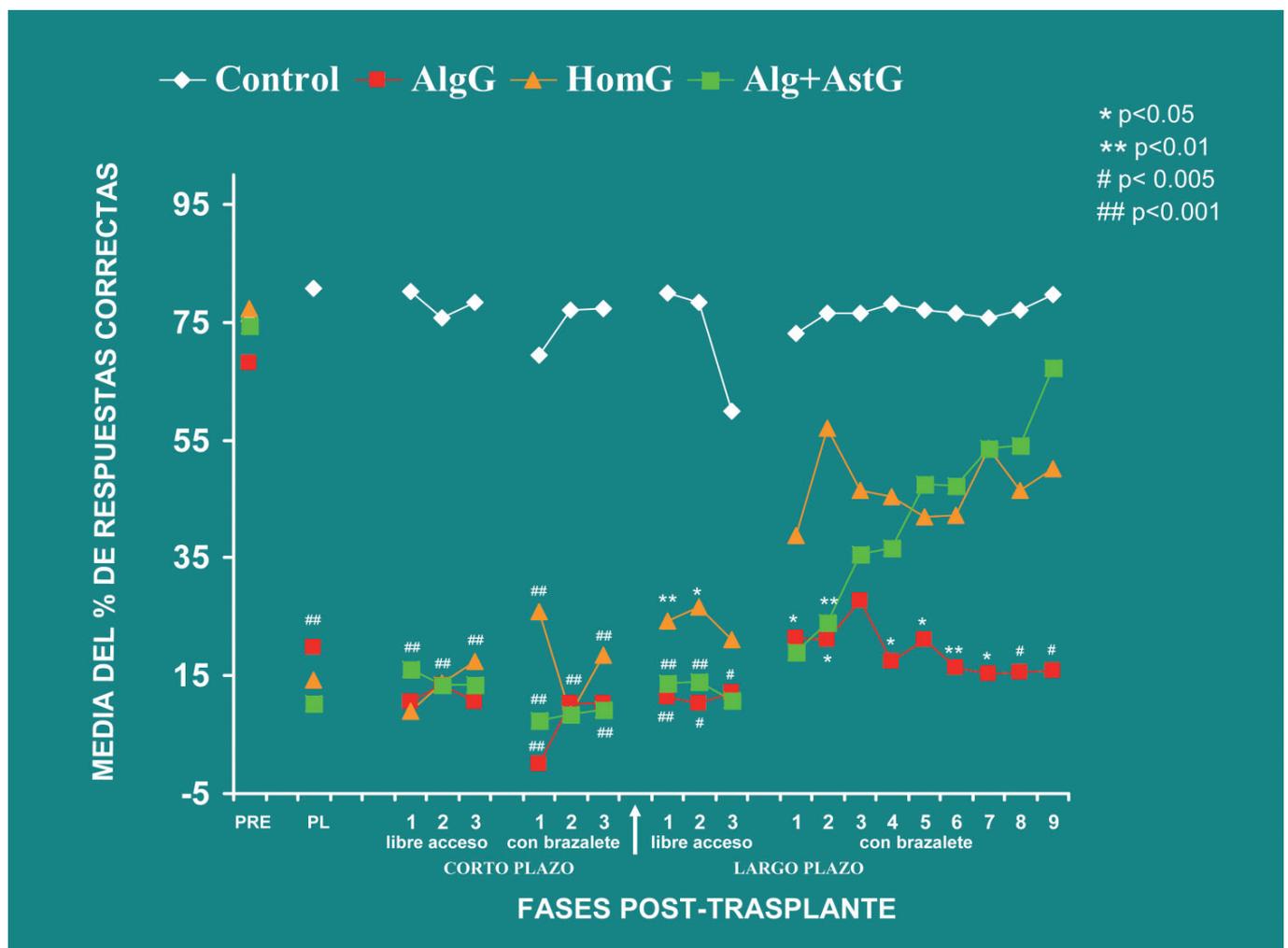


Figura 6. Resultados de la media del porcentaje de respuestas correctas con la mano preferente respecto al número total de respuestas con ambas manos, en el test de habilidad motora fina en las fases preoperatoria (PRE), post-lesión (PL) y post-trasplante. En la fase post-trasplante los animales fueron evaluados en dos periodos de tiempo: a corto plazo (a los 20 días de la realización de los trasplantes) y a largo plazo (a los tres meses post-trasplante). En cada periodo de tiempo los animales fueron evaluados en dos condiciones: con acceso libre a la comida con ambas manos (acceso libre) y con el uso obligado de la mano preferente (con brazaletes). Los niveles de significación son con respecto al grupo control. Control: grupo control; AlgG: grupo de animales con trasplante de esferas de alginato sin astrocitos; HomG: grupo de animales con trasplantes de tejido cortical de embriones de 16 días de desarrollo; Alg+AstG: grupo de animales con trasplantes de astrocitos encapsulados en esferas de alginato.

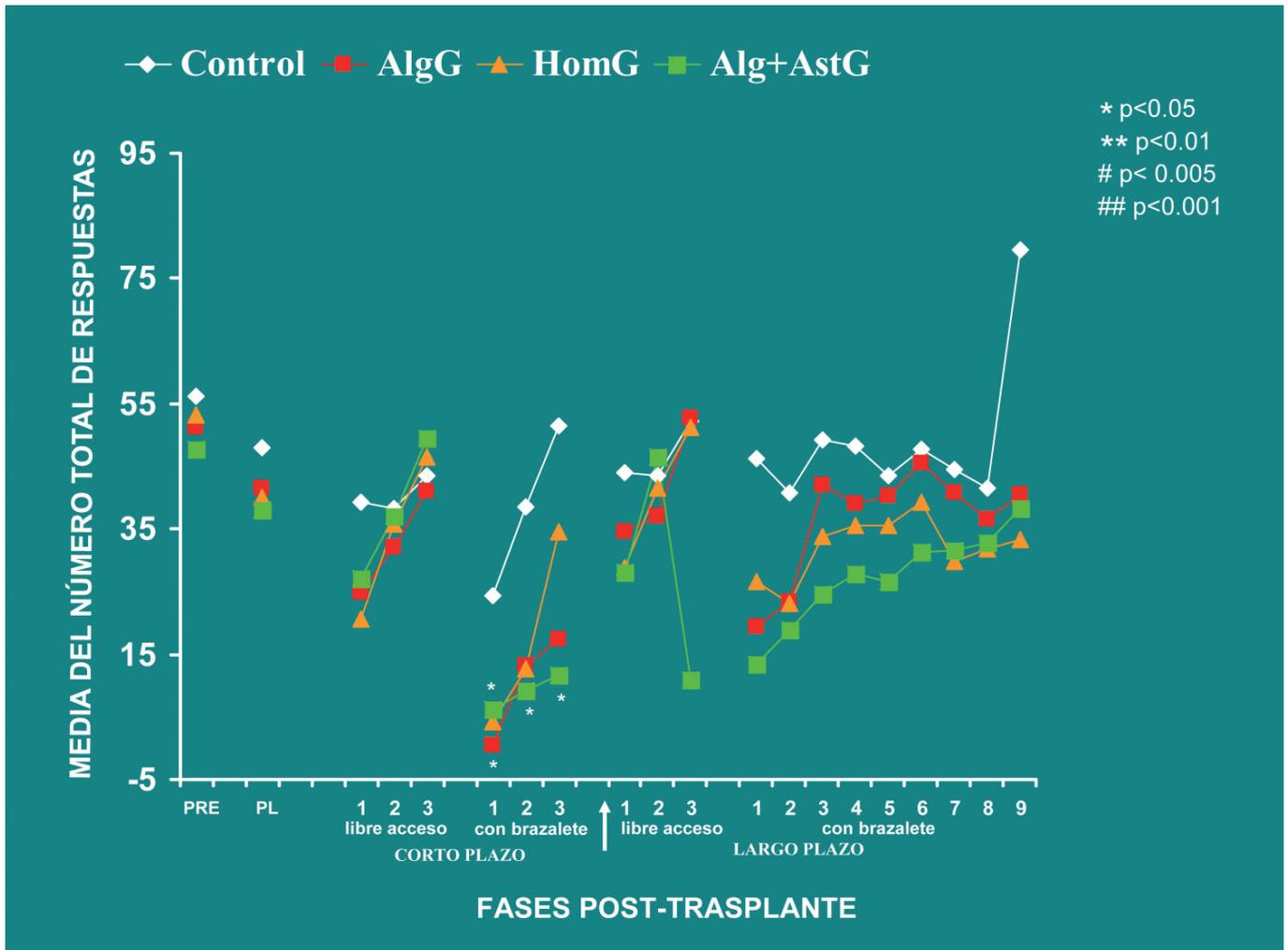


Figura 7. Resultados de la media del número total de respuestas (correctas + incorrectas) con ambas manos en el test de habilidad motora fina en las fases preoperatoria (PRE), post-lesión (PL) y post-trasplante. En la fase post-trasplante los animales fueron evaluados en dos periodos de tiempo: a corto plazo (a los 20 días de la realización de los trasplantes) y a largo plazo (a los tres meses post-trasplante). En cada periodo de tiempo los animales fueron evaluados en dos condiciones: con acceso libre a la comida con ambas manos (acceso libre) y con el uso obligado de la mano preferente (con brazaletes). Los niveles de significación son con respecto al grupo control. Control: grupo control; AlgG: grupo de animales con trasplante de esferas de alginato sin astrocitos; HomG: grupo de animales con trasplantes de tejido cortical de embriones de 16 días de desarrollo; Alg+AstG: grupo de animales con trasplantes de astrocitos encapsulados en esferas de alginato.

Por otra parte, cuando se compararon los porcentajes de respuestas correctas de los 3 grupos de animales con trasplante (HomG, Alg+AstG y AlgG) se observó que eran similares en las siete primeras sesiones, no habiendo diferencias significativas entre los 3 grupos; sin embargo, en las sesiones 8 y 9 el porcentaje de respuestas correctas de los animales con trasplantes de astrocitos presentó diferencias significativas con respecto a los animales con trasplantes de esferas de alginato sin astrocitos ($p \leq 0,05$ para la sesión 8 ; $p \leq 0,005$ para la sesión 9) (Fig. 6).

Con respecto al número total de respuestas. En la figura 7 se representa la 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 datos obtenidos no mostraron diferencias significativas en el número total de respuestas entre los cuatro grupos, en las fases preoperatoria y post-lesión. En la fase post-trasplante tam-

poco se encontraron diferencias significativas entre los cuatro grupos, excepto en la fase a corto plazo con brazaletes, en la cual en la primera sesión, todos los animales trasplantados presentaron un menor número de respuestas totales comparados con los animales controles; sin embargo, en la segunda y tercera sesión sólo los animales con trasplantes de astrocitos mostraron un menor número de respuestas totales con respecto a los animales controles ($p \leq 0,05$) (Fig. 7, corto plazo con brazaletes).

3.2. Resultados histológicos e inmunocitoquímicos

Una vez completados los estudios conductuales los animales fueron procesados para investigar las características histológicas e inmunocitoquímicas de los cerebros y de los trasplantes.

Todos los animales con trasplantes de tejido cortical embrionario sobrevivieron a los tres meses post-trasplante,

Tabla 1. Tiempo de coagulación de dos ratas con trasplantes de astrocitos encapsuladas en esferas de alginato y de dos ratas controles.

Ratas	Latencia de inicio del coágulo (seg)	Formación del coágulo (seg)	Retracción del coágulo (seg)
Control	250	315	540
Control	240	480	720
Alg + astrocitos	180	240	510
Alg + astrocitos	175	380	580

excepto uno que murió tras la realización del trasplante. La tasa de supervivencia de los trasplantes fue del 100%, a los tres meses de la realización del trasplante. En la mayoría de los animales con trasplantes de tejido cortical, la cavidad producida por la lesión se presentó rellena por tejido neural relativamente bien organizado. La citoarquitectura de los trasplantes corticales, presentó agrupaciones de células separados por haces de fibras, presentando las células diferentes tamaños. En ningún caso, se observó la estratificación característica de la corteza normal del huésped. Estas características morfológicas son similares a las que presentan los trasplantes de tejido cortical en otros estudios (Riolobos y cols. 2001, Heredia y cols. 2009).

Todos los animales con trasplantes de esferas de alginato (tanto con astrocitos como sin astrocitos) sobrevivieron a los tres meses post-trasplante, excepto uno que murió tras la fase comportamental a corto plazo.

Cuando los animales con trasplantes de esferas de alginato (tanto con astrocitos como sin astrocitos), se perfundieron, por vía intracardiaca, para el procesamiento histológico de los cerebros, se observó, sistemáticamente, que a los pocos minutos del comienzo de la perfusión de la solución fijadora el flujo se iba enlenteciendo hasta quedar, poco más tarde, totalmente suprimido. Circunstancia que en ningún caso se presentó ni en los animales con trasplantes de tejido cortical embrionario ni en los animales controles. Tras la extracción del cerebro se pudo comprobar que el cerebro no había quedado correctamente fijado. Sin embargo, en el 100 % de los animales con trasplantes de esferas de alginato (con astrocitos o sin astrocitos), a los siete meses de la realización de los trasplantes, las esferas de alginato permanecían en la cavidad donde se habían trasplantado. Este problema en la perfusión de los animales con la solución fijadora, es la primera vez que se nos ha presentado en nuestro laboratorio. Para intentar subsanarlo se hicieron distintos ensayos: en un animal se extrajeron las esferas de alginato de la cavidad del huésped, y cuatro días después se procedió a perfundir la rata, sin embargo, este procedimiento no indujo ninguna mejoría en la perfusión del animal; en otro animal se añadió heparina a la solución de lavado, previa al fijador, pero tampoco en este caso se mejoró la perfusión; por último, a otro animal se le inyectó heparina (10 mg/Kg de peso), por vía intraperitoneal, 1 hora antes de la perfusión, y este procedimiento si que indujo una cierta mejoría de la

perfusión y fijación de los cerebros de los animales, lo que nos sugirió que en los animales con esferas de alginato podría haber una alteración en el proceso de coagulación. En este sentido, a tres ratas (2 con trasplantes de astrocitos encapsulados en esferas de alginato y 1 rata control), se les hizo un hemograma, sin embargo, no se detectaron alteraciones, en los parámetros valorados en el hemograma, en las ratas con trasplantes de alginato comparados con la rata control. A la vista de estos resultados, realizamos un ensayo del tiempo de coagulación en algunos animales (n=4, 2 animales con trasplantes de esferas de alginato + astrocitos y 2 ratas controles sin trasplante), para investigar alteraciones en el proceso de hemostasia. Los resultados pusieron de relieve que en los animales con trasplantes de esferas de alginato + astrocitos, el tiempo de latencia de inicio de la formación del coágulo fue menor que en los animales controles, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,01$) (Tabla 1). No obstante, sería necesario profundizar en estas investigaciones.

En los animales con trasplantes de esferas de alginato, a los siete meses post-trasplante, tras la fijación del cerebro, se extrajeron las esferas de alginato de la cavidad del huésped; las cuales, *de visu*, no presentaron modificaciones aparentes en su morfología. Sin embargo, cuando las esferas se introdujeron en un medio líquido para su ulterior procesamiento (fijador, medio de cultivo, solución de Krebs), se disolvieron a los pocos minutos y desaparecieron en la solución. A la vista de este hallazgo, nos propusimos investigar si las esferas de alginato habían sufrido alguna modificación química durante su permanencia en el cerebro del huésped. En este sentido, se hicieron nuevas esferas de alginato (sin astrocitos) y se introdujeron en distintos medios: solución de Krebs, medio de cultivo y suero fisiológico. Después de 5 meses, las esferas de alginato permanecieron en los distintos medios, sin modificaciones aparentes en su estructura.

En algunos animales con trasplantes de esferas de alginato con astrocitos, tras la fijación de los cerebros se investigó la supervivencia de los astrocitos encapsulados en las esferas, utilizando métodos inmunocitoquímicos para la localización de la GFAP. En ninguna de las esferas investigadas se observaron células GFAP positivas.

Una vez extraídas las esferas de alginato, los cerebros se procesaron mediante técnicas histológicas convencionales (tinción con violeta de cresilo para la sustancia de

Nissl) para investigar la localización y el tamaño de las lesiones. En la mayoría de los animales con trasplantes de esferas de alginato, con o sin astrocitos, se pudo constatar, 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 (Fig. 8).



Figura 8. Cerebro de una rata con un trasplante de astrocitos encapsulados en una esfera de alginato. Se aprecia el gran tamaño de la cavidad y una esfera trasplantada dentro de ella.

En resumen nuestros resultados han mostrado que tanto los animales con trasplantes de astrocitos encapsulados en esferas de alginato como los animales con trasplantes de tejido cortical embrionario presentaron una mejoría/recuperación en el déficit en la habilidad manual producido por la lesión de la corteza motora. Esta mejoría/recuperación se puso de manifiesto cuando los animales fueron forzados a utilizar la mano afectada por la lesión. Por otra parte, la interacción de las esferas de alginato con el cerebro huésped indujo, a largo plazo, un aumento sustancial en el tamaño de la lesión determinado, probablemente, por procesos de necrosis y muerte celular inducidos por circunstancias que actualmente desconocemos. Esta destrucción celular podría ser la causa de la liberación de diversos factores, algunos de los cuales (como por ejemplo, el factor tisular), podría estar involucrado en las alteraciones en la hemostasia que se observa en estos animales. Asimismo, estos factores podrían desencadenar diversos mecanismos que podrían ser la causa de los cambios en la naturaleza química del alginato, y que podrían estar asociados a la disolución de las esferas tras su extracción del cerebro y su inmersión en un medio líquido. No obstante, serían necesarias más investigaciones para profundizar en estos aspectos.

4. CONCLUSIONES

1. La lesión de la corteza frontal motora, en ratas adultas, induce un déficit en la habilidad motora fina.
2. Tanto los trasplantes de tejido cortical embrionario como los trasplantes de astrocitos encapsulados en esferas de alginato produjeron una mejoría/recuperación del déficit en la habilidad motora fina causado por la lesión de la corteza frontal.
3. Esta mejoría/recuperación inducida por los trasplantes de tejido cortical o por los trasplantes de astrocitos se puso de relieve cuando los animales fueron obligados a utilizar la mano afectada por la lesión.
4. Los animales con trasplantes de esferas de alginato sin astrocitos no presentaron ninguna mejoría del déficit motor producido por la lesión.
5. La interacción de los trasplantes de esferas de alginato con el cerebro huésped indujo, a largo plazo, alteraciones tanto en el huésped como en la naturaleza del alginato.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altman, J., Bayer S.A. (1995). "Atlas of prenatal rat brain development". Boca Raton, Florida, CRC Press Inc.
- Heredia M, Riobos 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* 2009. En prensa.
- Neafsey EJ, Bold, EL, Haas G, Hurley-Gius KM, Quirk G, Sievert CF, Terreberry RR. The organization of the rat motor cortex: a microstimulation mapping study. *Brain Res* 1986; 1: 77-96.
- 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 (5): 207-210.
- Orive G, Carcaboso AM, Hernández RM, Gascón AR, Pedraz JL. Biocompatibility evaluation of different alginates and alginate-based microcapsules. *Biomacromolecules* 2005; 6: 927-931.
- Riobos AS, Heredia M, de la Fuente JA, Criado JM, Yajeya J, Campos J, Santacana M. 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 and Mem* 2001; 75:274-292.

6. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este estudio se presentarán en el "Joint Congress of Federation European Physiological Societies and Turkish Society of Physiological Sciences. Septiembre de 2011. Una vez presentadas las comunicaciones se enviarán fotocopias de las mismas a FUNDACIÓN MAPFRE.

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.