

ORIGINAL

Uso de biomateriales con fines neuroregenerativos. Aplicación en modelo experimental de traumatismo craneoencefálico

Use of biomaterials in neural regeneration. Application in an experimental model of head injury

Soria J M^{1*}, Martínez Ramos C¹, Andrades J A^{3*}, García Esparza M A¹, Barcia C⁵, Monleón Pradas M⁴, García-Verdugo J M^{2*}

¹ Facultad Ciencias de la Salud, Universidad CEU Cardenal Herrera. Avda Seminario 46113 Moncada, Valencia. ² Instituto Cavanilles. Universidad de Valencia. ³ Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. CIBER-BBN. ⁴ Centro de Biomateriales. Universidad Politécnica de Valencia. CIBER-BBN. ⁵ Servicio de Neurocirugía, Hospital General Universitario de Valencia. * CIBER de Enfermedades Neurodegenerativas, Valencia.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivos: Evaluar el rendimiento de los biomateriales poliméricos basados en ácido hialurónico y su utilidad en el Sistema Nervioso Central, sirviendo como soporte, para la supervivencia y diferenciación celular.

Material y Metodos: Con el fin de evaluar la viabilidad de los soportes poliméricos y acanalados, se realizaron experimentos *in vitro* e *in vivo* mediante el implante en corteza cerebral de ratas Wistar. Mediante técnicas inmunocitoquímicas e histológicas se procedió al análisis de la viabilidad de los soportes.

Resultados: Tras el cultivo pudimos constatar la viabilidad celular sobre los biomateriales, así como su potencial utilidad para la regeneración *in vivo* de estructuras vasculares y neurales.

Conclusiones: La posibilidad de regenerar estructuras vasculares y neurales a través del implante de biomateriales basados en ácido hialurónico, constituye un avance en la utilización de biomateriales en el Sistema Nervioso Central.

Palabras clave:

Biomateriales, sistema nervioso central, células troncales neurales.

Abstract

Objetivos: To evaluate the performance of polymeric biomaterials based on hyaluronic acid and their usefulness in the central nervous system as support for cell differentiation and survival.

Material and methods: With the purpose of assessing the viability of polymeric cannulated scaffolds, *in vitro* and *in vivo* experiments were made involving implantation in the Wistar rate brain cortex. Immunocytochemical and histological techniques were used to analyze scaffold viability.

Results: Following culture, cell viability on the biomaterials was confirmed, together with the potential usefulness of the latter for the *in vivo* regeneration of vascular and neural structures.

Conclusions: The possibility of regenerating vascular and neural structures through the implantation of biomaterials based on hyaluronic acid constitutes an advance in the use of biomaterials in the central nervous system.

Key words:

Biomaterials, central nervous system, neural stem cells.

Correspondencia

J. M. Soria
Facultad Ciencias de la Salud, Univ. CEU- Cardenal Herrera
Moncada 46311 (Valencia)
jose.soria@uch.ceu.es

I Introducción

Las lesiones producidas a partir de traumatismos craneoencefálicos provocan por lo general una pérdida importante de masa cerebral, neuronas, glía y vasos sanguíneos. Para poder establecer una buena estrategia en términos de regeneración o reconstrucción, se plantean dos problemas a resolver, por un lado, encontrar poblaciones celulares, tanto neuronales como endoteliales adecuadas y que regeneren las áreas dañadas y el segundo, que esas nuevas células interactúen de manera adecuada con el entorno del parénquima cerebral.

El primer problema podría resolverse mediante la utilización adecuada de células madre adultas contenidas en determinadas porciones del cerebro adulto. Las células madre vienen definidas como tal cuando cumplen al menos dos características, por un lado deben poseer la capacidad de dividirse (autorrenovación) durante un periodo indefinido, a menudo durante toda la vida del organismo, y por otro que en determinadas condiciones (ambiente, cultivo) puedan dar lugar (diferenciación) a diferentes tipos celulares, es decir, sean capaces de generar células maduras con formas y funciones específicas, como células cardíacas, células de la piel o células nerviosas. El segundo problema aparece cuando, en casos de una severa pérdida de tejido, se generan auténticas cavidades císticas de forma que resulta prácticamente imposible una reconstrucción tisular sin una previa organización intrínseca que ayude a la reconstrucción; es decir, se hace necesaria la presencia de una estructura a modo de andamio o membrana que permita una mínima organización de las células transplantadas. [1].

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 estructuras como rótulas o como moldes para el crecimiento óseo [2].

El objetivo de nuestro trabajo es evaluar el rendimiento de los biomateriales poliméricos basados en el ácido hialurónico y su utilidad en la regeneración del sistema nervioso central, sirviendo como soporte, permitiendo la supervivencia y diferenciación celular.

I Material y Métodos

Caracterización de los biomateriales tridimensionales basados en ácido hialurónico

Los materiales poliméricos basados en hialurónico fueron tratados con agua destilada 24 h y posteriormente con medio de cultivo DMEM sin suplementar, para hidratar los biomateriales a utilizar como sustratos artificiales.

Tras hidratación los biomateriales fueron fijados en paraformaldehído 4% en PB 0,1M pH 7,5, incluidos en resina OCT y cortados en secciones con distintos espesores. Se pudieron obtener sin dificultad secciones de 20µm de espesor mediante criostato (Leica).

Viabilidad de los biomateriales poliméricos basados en ácido hialurónico *in vitro*

Con el fin de evaluar la viabilidad y valorar la adhesión celular, los distintos biomateriales se depositaron en placas P96 y fueron incubados con medio de cultivo para su hidratación. Posteriormente se procedió al lavado de los biomateriales mediante 3 incubaciones en agua destilada. Entonces fibroblastos humanos fueron cultivados (50.000c/cm²) sobre la superficie de los biomateriales. En medio DMEM (Invitrogen) suplementado con Suero humano 10%, durante 3 días en condiciones de 37° C y 5% CO₂.

Implante de biomateriales en corteza cerebral adulta

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 Wistar con un peso comprendido entre 250-300g. Los animales fueron anestesiados con una solución compuesta de clorhidrato de ketamina (Ketolar, Parke-Davis SL) (75 mg/Kg), diazepam (Valium. 10, Roche Farma S.A.) (7.5 mg/Kg) y sulfato de atropina (Atropina Braun, Braun Medical SA) (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. 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 trépano o perforación del cráneo. Así pues, se implantó el biomaterial con ayuda de fórceps de microcirugía (Figura 1).

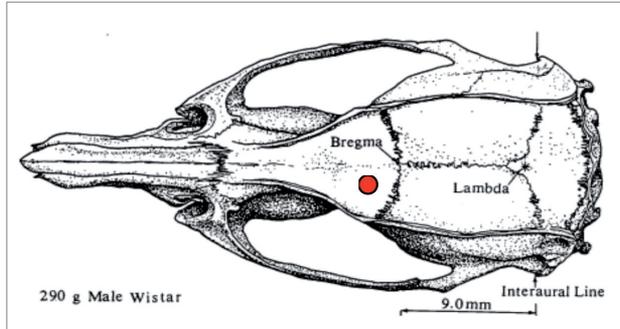


Fig. 1. Punto de implante en la corteza cerebral del biomaterial.

Estudio histológico tras el implante

Tras un mes del implante, los cerebros a los cuales se les implantaron biomateriales fueron tratados mediante técnicas de histología y de inmunohistoquímica, que determinaran junto con un análisis de microscopía electrónica y confocal fenómenos como la muerte celular, proliferación y diferenciación celular.

Así mismo, tras la perfusión, se procedió a la fijación para la conservación del tejido cerebral. Tras la disección del cerebro transplantado, este fue incluido y cortado en secciones mediante el uso de criostato, vibrátomo y micrótopo. Mediante técnicas de inmunocitoquímica, se valoraron procesos de muerte celular, diferenciación dendrítica, proliferación y angiogénesis.

Tinción histológica

Se realizó una tinción con Hematoxilina-Eosina. La hematoxilina es un colorante catiónico mientras que la eosina es un colorante aniónico perteneciente a los xantenos. Se tiñeron los núcleos en azul, violeta oscuro a negro y de rojo el citoplasma, colágeno, queratina y eritrocitos. El primer paso fue hidratar progresivamente el tejido durante 3 minutos en cada alcohol (100°, 96°, 70°, 50°, 30°). A continuación se lavó con H₂O destilada y con H₂O corriente (grifo).

Tabla 1. Lista de marcadores utilizados

Proceso	Anticuerpo
Biocompatibilidad y reacción de gliosis astrocitaria	anti-GFAP (Sigma no G-3893)
Biocompatibilidad y reacción de microglía	antiCD68 (Invitrogen)
Presencia de Neuronas maduras	Anti Tuj1 (Babco no MMS-435P)
Presencia de neuroblastos	PSANCAM (Chemicon no MAB377B)
Angiogénesis	Anti-CD31 (Invitrogen)
Proliferación celular	Antiki67 (DAKO, no M7240)

Durante 7 minutos se bañó con Hematoxilina de Harris (Sigma, HHS-16) diferenciando con Alcohol Clorhídrico (HCl). El siguiente paso consistió en lavar con H₂O corriente antes de teñir durante 3 minutos con Eosina acuosa (Sigma, 212954). Como paso final se deshidrató el tejido con alcohol de 96° y de 100° y se montó con Eukitt.

Estudio inmunocitoquímico

Los resultados obtenidos a partir de técnicas histológicas se contrastaron mediante inmunocitoquímica y fueron evaluados mediante el uso de microscopía óptica y fluorescente confocal. Se procedió a la inmunocitoquímica con los marcadores referenciados en la Tabla 1.

I Resultados

1. Caracterización del biomaterial acanalado tridimensional basado en ácido hialurónico

Tras hidratación, los biomateriales aparecieron completamente transparentes lo cual facilitó el paso de luz para su posterior observación mediante microscopía óptica. La Figura 2 muestra el aspecto de los biomateriales poliméricos antes (opacos a derecha) y después de la hidratación (completamente transparentes a la izquierda). Tras hidratación los biomateriales y corte en criostato, se pudo observar la estructura y consistencia del biomaterial. La figura 3 muestra el aspecto bien definido de las secciones cortadas tras

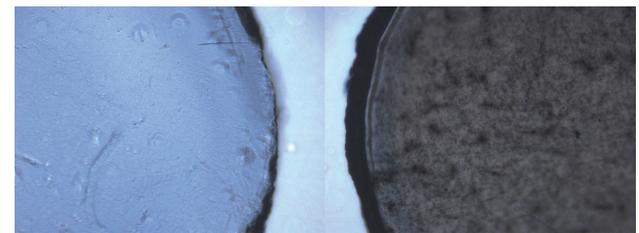


Fig. 2. Aspecto macroscópico de los biomateriales tras el proceso de hidratación.

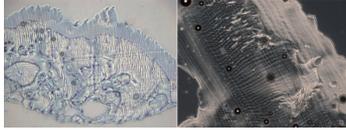


Fig. 3. Aspecto y estructura del biomaterial polimérico basado en ácido hialurónico.

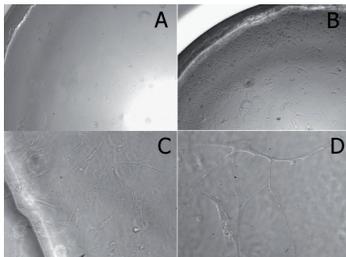


Fig. 4. Cultivo de Fibroblastos humanos sobre biomateriales poliméricos basados en ácido hialurónico. Tras el cultivo, se aprecia la presencia de gran cantidad de fibroblastos con extensiones citoplasmáticas.

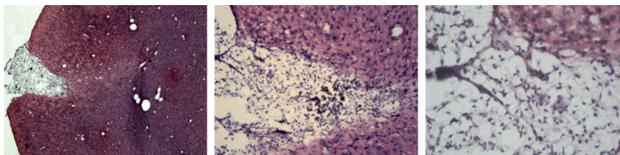


Fig. 5. Aspecto del biomaterial colonizado por células neurales y vasos sanguíneos transcurridos 2 meses desde el implante cerebral.

inclusión y corte de los biomateriales poliméricos basados en ácido hialurónico.

2. Estudio de viabilidad celular, *in vitro*

2.1 Estabilidad del pH y condiciones de cultivo

Tras la fabricación de biomateriales se procedió 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 ácidas por parte del biomaterial. No obstante se procedió al cultivo de células humanas para determinar el grado de viabilidad y supervivencia así como adhesión celular.

2.2 Cultivo de fibroblastos sobre biomateriales poliméricos basados en ácido hialurónico

Mediante el cultivo celular de fibroblastos humanos se pudo determinar la capacidad de estos biomateriales poliméricos basados en ácido hialurónico para soportar el crecimiento y proliferación celular. Así, tras 24h de cultivo, (Figura 3)

numerosos fibroblastos con aspecto fusiforme fueron observados sobre aquellos biomateriales recubiertos por fibronectina, sin embargo aquellos biomateriales formados por HA que no fueron recubiertos con fibronectina no resultaron viables para el cultivo de fibroblastos (Figura 4).

Pudimos descartar la liberación de sustancias tóxicas por parte del biomaterial al encontrar fibroblastos en el fondo de de placa y bajo el biomaterial.

3. Implante de biomateriales basados en ácido hialurónico (HA) en corteza cerebral de rata adulta

Transcurridos dos meses desde el implante de biomateriales basados en ácido hialurónico en corteza cerebral, se procedió al estudio histológico mediante tinción con hematoxilina eosina (Figura 5). Así, el material quedó integrado en el parénquima de la corteza cerebral (CC). Tras la tinción, podemos comprobar como tras dos meses desde el implante gran cantidad de células nerviosas colonizaron el biomaterial. Además resulta evidente la presencia de vasos sanguíneos integrados en el biomaterial tras el implante. Como se puede observar tras dos meses desde el implante del biomaterial, células nerviosas colonizaron la totalidad del implante y generaron numerosas proyecciones generando un entramado neural.

Los biomateriales fueron implantados en corteza cerebral (Figura 6). Cuando realizamos inmunocitoquímica para el marcador neuronal Tuj1 (verde), para neuronas, observamos como axones y cuerpos celulares se internalizaron en el biomaterial implantado tras dos meses de permanencia. Detalles de estos axones y terminaciones nerviosas se muestran en la micrografía de la derecha en donde en azul, se muestran los núcleos de las células nerviosas y en verde aquellas neuronas con sus terminaciones nerviosas y dendritas en el interior del biomaterial implantado.

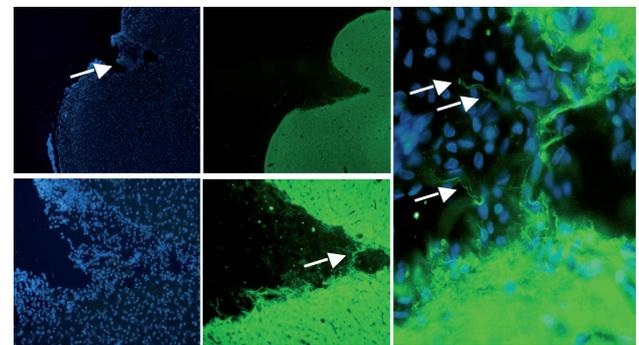


Fig. 6. Aspecto del biomaterial colonizado por células neurales inmunoreactivas para Tuj1 transcurridos 2 meses desde el implante cerebral.



Fig. 7. Aspecto del biomaterial transcurridos 2 meses desde el implante y colonizado por vasos sanguíneos inmunoreactivos para CD31 (verde). Los núcleos celulares aparecen marcados con DAPI (azul).

En el intento de poder determinar de forma específica la formación de vasos sanguíneos, se procedió a inmunocitoquímica para el marcador de Cd31 (Figura 7).

Discusión

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 [3][4], 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. Sin embargo, en procesos de regeneración, no solo es importante un soporte que garantice una organización celular intrínseca, ayudando como estructura guía, en este sentido, recientes estudios referidos a procesos de regeneración del sistema nervioso han puesto de manifiesto la importancia en el uso de factores neurotróficos [5] y de matrices celulares [6][7] como componentes fundamentales en el mantenimiento de un microambiente favorable para la supervivencia y diferenciación celular [7-9]. Como consecuencia, es por tanto necesario considerar la utilización de estromas o cubiertas celulares con el fin de mejorar la capacidad de diferenciación de las células progenitoras implantadas ayudando a mejorar el rendimiento del sistema, así como también la revascularización. De este modo, los biomateriales poliméricos se pueden usar como membranas para promover la adhesión celular y una correcta diferenciación celular, así como en el problema que nos atañe en dirigir la arborización celular, el crecimiento axonal de las células sirviendo de ayuda en la función de matriz extracelular. Se ha estudiado fundamentalmente en la regeneración del sistema nervioso periférico (SNP) con gran variedad de materiales [10-15]. Sin embargo hay pocos estudios que empleen los biomateriales en el SNC y la mayoría de ellos, se centran en la regeneración de estructuras cuyas fibras están geométricamente ordenadas como la médula espinal o el nervio óptico. Por otro lado, los polímeros, tanto de origen natural como sintético, se han utilizado relativamente poco en la recons-

trucción 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 [16-23].

En la actualidad, estamos evaluando el rendimiento de distintos biomateriales para la reconstrucción de la corteza adulta [12][18][23]. En este estudio analizamos la supervivencia y de diferenciación neural desde un punto de vista meramente histológico e inmunocitoquímico pero que tras los resultados en modelos experimentales de isquemia cerebral, cinco biomateriales de los estudiados podrían constituir la base para futuros proyectos encaminados al uso de biomateriales en terapia de regeneración y reconstrucción. Sin embargo, parámetros como el carácter electrofisiológico, o el grado de integración neural en el cerebro a través de la generación de nuevas conexiones intercelulares, resulta fundamental para conocer, evaluar y garantizar el uso adecuado de biomateriales con fines regenerativos. En este nuevo proyecto que se solicita, la evaluación *in vivo* de diferenciación e integración neuronal en términos de nuevas sinapsis y conexiones entre neuronas implantadas a través de biomateriales y el parénquima de la corteza cerebral usando modelos de roedores con pérdida de una porción de parénquima cortical cerebral y que actualmente se generan en nuestro laboratorio.

A la luz de los resultados obtenidos y tras comprobar, la posibilidad de regenerar estructuras vasculares y neurales a través del implante conectando zonas de parénquima cortical tras un proceso traumático y a través de biomateriales basados en ácido hialurónico, constituye un avance en la utilización de biomateriales en el sistema nervioso central, pudiendo constituir la base para futuras estrategias de reconstrucción y regeneración clínicamente efectivas. **I**

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación por parte de FUNDACIÓN MAPFRE (ayudas a proyecto de investigación 2007) y gracias al programa de apoyo a investigación Universidad CEU-Cardenal Herrera. Copernicus-Santander (PRCEU-UCH/COP01/08).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Atzei A, Calcagni M, Breda B, Fasolo G, Pajardi G, Cugola L. Clinical evaluation of a hyaluronan-based gel following microsurgical reconstruction of peripheral nerves of the hand. *Microsurgery* 2007; 27:2-7.



2. Rumpel E, Wolf E, Kauschke E, Bienengraber V, Bayerlein T, Gedrange T, et al. The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes in vivo. *Folia Morphol* 2006; 65:43-8.
3. Yeo A, Rai B, Sju E, Cheong JJ, Teoh SH. The degradation profile of novel, bioresorbable PCL-TCP scaffolds: An in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res A* 2008; 84:208-18.
4. McCloskey KE, Gilroy ME, Nerem RM. Use of embryonic stem cell-derived endothelial cells as a cell source to generate vessel structures in vitro. *Tissue Eng* 2005; 11:497-505.
5. Oh SH, Kang SG, Lee JH. Degradation behavior of hydrophilized PLGA scaffolds prepared by melt-molding particulate-leaching method: comparison with control hydrophobic one. *J Mater Sci Mater Med* 2006; 17:131-7.
6. Laczka-Osyczka A, Laczka M, Kasugai S, Ohya K. Behavior of bone marrow cells cultured on three different coatings of gel-derived bioactive glass-ceramics at early stages of cell differentiation. *J Biomed Mater Res* 1998; 42:433-42.
7. Vallet-Regi M. Revisiting ceramics for medical applications. *Dalton Trans* 2006; 44:5211-20.
8. Day RM, Boccaccini AR, Shurey S, Roether JA, Forbes A, Hench LL, et al. Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 2004; 25:5857-66.
9. Sanders JE, Lamont SE, Karchin A, Golledge SL, Ratner BD. Fibro-porous meshes made from polyurethane microfibers: effects of surface charge on tissue response. *Biomaterials* 2005; 26:813-8.
10. Yuan Y, Zhang P, Yang Y, Wang X, Gu X. The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. *Biomaterials* 2004; 25:4273-8.
11. Georges PC, Miller WJ, Meaney DF, Sawyer ES, Janney PA. Matrices with compliance comparable to that of brain tissue select neuronal over glial growth in mixed cortical cultures. *Biophys J* 2006; 90:3012-8.
12. Soria JM, Martínez Ramos C, Bahamonde O, García Cruz DM, Salmerón Sánchez M, Barcia JA, et al. Influence of the substrate's hydrophilicity on the in vitro Schwann cells viability. *J Biomed Mater Res A* 2007; 83:463-70.
13. Keilhoff, G, Stang F, Wolf G, Fansa H. Bio-compatibility of type I/III collagen matrix for peripheral nerve reconstruction. *Biomaterials* 2003; 24:2779-87.
14. Anselin AD, Fink T, Davey DF. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with adult Schwann cells. *NeuroPathol Appl Neurobiol* 1997; 23:387-98.
15. Rodriguez FJ, Verdu E, Ceballos D, Navarro X. Nerve guides seeded with autologous schwann cells improve nerve regeneration. *Exp Neurol* 2000; 161: 571-84.
16. Mahoney MJ, Anseth KS. Three-dimensional growth and function of neural tissue in degradable polyethylene glycol hydrogels. *Biomaterials* 2006; 27:2265-9.
17. Nisbet DR, Pattanawong S, Nunan J, Shen W, Horne MK, Finkelstein DI, et al. The effect of surface hydrophilicity on the behavior of embryonic cortical neurons. *J Colloid Interface Sci* 2006;15; 299:647-55.
18. Martínez-Ramos C, Lainez S, Sancho F, García Esparza MA, Planells-Cases R, García Verdugo JM, et al. Differentiation of postnatal neural stem cells into glia and functional neuronson laminin-coated polymeric substrates. *Tissue Eng Part A* 2008; 14:1365-75.
19. Young TH, Hung CH. Behavior of embryonic rat cerebral cortical stem cells on the PVA and EVAL substrates. *Biomaterials* 2005; 26:4291-9.
20. Wong DY, Hollister SJ, Kresbach PH, Nosrat C. Poly(epsilon-caprolactone) and poly (L-lactic-co-glycolic acid) degradable polymer sponges attenuate astrocyte response and lesion growth in acute traumatic brain injury. *Tissue Eng* 2007; 13:2515-23.
21. Hou S, Xu Q, Tian W, Cui F, Cai Q, Ma J, et al. The repair of brain lesion by implantation of hyaluronic acid hydrogels modified with laminin. *J Neurosci Methods* 2005; 148:60-70.
22. Park KI, Teng YD, Snyder EY. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. *Nat Biotechnol* 2002; 20:1111-7.
23. Soria JM, Martinez Ramos C, Salmeron M, Benavent V, Campillo A, Gomez JL, et al. Survival and differentiation of embryonic neural explants on different biomaterials. *J Biomed Mater Res A* 2006; 79:495-502.

Conflicto de intereses

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