



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias  
División de Ciencias Biológicas  
Departamento de Ciencias Ambientales  
**INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS**

## Efectos de la quitosana intracerebral sobre la neurodegeneración y la reactividad glial en ratas

Tesis  
que para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS DEL COMPORTAMIENTO**  
(OPCIÓN NEUROCIENCIAS)

presenta

**Martha Eugenia Morales Vázquez**

Comité tutelar

**Dr. Joaquín García Estrada (Director)**

Dra. Sonia Luquín de Anda

Dra. Marisela Hernández González

268676 / 1038427  
P504  
EJ. 2

## DEDICATORIAS

Esta tesis esta dedicada a buscar a través de la investigación científica el beneficio de tantas personas que se encuentran limitadas en sus funciones por daños en el sistema nervioso ocasionados por distintas razones (enfermedad crónica y/o degenerativa, traumatismos cráneo-encefálicos etc.). Si bien este trabajo no es la panacea en cuanto a logros en ese sentido, al menos pretende ser un antecedente para continuar el camino en el desarrollo de estrategias para favorecer la recuperación de las funciones nerviosas perdidas.

Tambien esta dedicada a todas las personas que creyeron en mi, y que creyendo en mi, me apoyaron durante todo este tiempo de diferentes formas, siendo la más constante: "animo sigue adelante y no te rindas, cada vez te falta menos".

## AGRADECIMIENTOS

Es necesario ser agradecido porque de esta forma reconoces que el trabajo no lo hiciste solo, reconoces que tuviste a mucha gente detrás de ti para ayudarte, y no debes jamás dejar de ser agradecido, pues de esta forma seguirás reconociendo el apoyo de toda la gente a tu alrededor y eso facilitara el camino para el éxito: "buscar el beneficio de todos".

El primer agradecimiento se lo dedico a Dios, que me hizo capaz para lograr esta tan difícil meta.

De modo que en este sentido debo dar gracias a mis padres, que como me empujaron a que siguiera (Felizardo y Josefina), mis hermanos (Caty, Moni, Felizardo, José Manuel, Carlos, Luis y Güero) mis amigos en este proceso, que siempre me ayudaron y me mostraron su apoyo incondicional (Rocío, Oscar, Lizbeth, Adriana, Carlos, Ulises, Jorge, Angélica y más), a las personas que en diferentes momentos me asesoraron (Dra. Alicia, Dra. Esthela, Susi, Ricardo, Dr. Sergio Meneses Dr. Ramos y Dr. Aceves), a los miembros de mi comité tutorial que me acompañaron siempre en el desarrollo de la tesis (Dra. Sonia y Dra. Marisela), a mi tutor que, a pesar de nuestras diferencias porque era yo muy terca, nos pudimos arreglar y resolver las cosas, también por su paciencia porque así logramos salir

adelante con la tesis (Dr. Joaquín), a mi marido, que siempre me animo todos los días para que yo siguiera con la tesis estos últimos dos años (Alejandro), a mi bebe que a pesar que ya le toco casi la última parte, vivió y sintió conmigo el último paso para obtener el grado.

El trabajo fue desarrollado en el Centro de Investigación Biomédica de Occidente del IMSS (División de Neurociencias) y el Laboratorio I del Depto. de Neurociencias del CUCS, U de G.

#### APOYOS FINANCIEROS.

**Efectos de la quitosana sobre la reorganización de la corteza cerebral de ratas adultas lesionadas por aspiración.** FOFOI, Clave: FP2001/085 Dr. Joaquín García Estrada / Martha E, Morales Vázquez. 2001-2002.

**Utilización de prótesis bioactivas de quitosana y el neuroesteroide pregnenolona para inducir la regeneración en el nervio facial axotomizado-tubulizado de conejos.** CONACYT, Clave: 28893. Dr en C Fernando López Dellamary-Toral / Joaquín García Estrada. 1998-2000.

**Desarrollo del polimero natural quitosana como biomaterial en aplicaciones biomedicas. Moldeo, microestructura y solubilidad.** CONACYT 47895 Inicio 1/06/2005 y terminación 31/12/2007 Responsable: Dr en C Fernando Antonio López Dellamary Toral. Responsable médico. Dr en C. Joaquín García Estrada.

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	VIII
<b>RESUMEN</b>	IX
<b>ABSTRAC</b>	X
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	3
1.1. Biomateriales	3
1.1.1. Quitosana	4
1.2. Modelos de lesión	9
1.2.1. Modelos de lesión cerebral en rata	11
1.3. Progresión del daño cerebral	12
1.3.1. Muerte neuronal	13
1.3.2. Reactividad glial	14
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	19
3.2. Hipótesis	20
3.3. Objetivos	20
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	22
4.1. Animales de experimentación	22
4.2. Preparación de quitosana	23
4.2.1. Lamina y gel de quitosana	23
4.3. Cirugía esterotóxica para lesión por aspiración	24
4.4. Prueba de barra de equilibrio	26
4.5. Fijación de los tejidos	27
4.5.1. Perfusión intracardíaca	28

4.5.2. Tinción de hematoxilina y eosina	29
4.5.3. Técnicas inmunocitoquímicas e histoquímicas	30
4.6. Procedimiento morfológico cuantitativo	33
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
5.1. Evaluación motora	36
5.2. Análisis morfológico	37
5.2.1. Índice de neurodegeneración	37
5.2.2. Histoquímico de microglia	39
5.2.3. Inmunocitoquímica de astrocitos	42
5.2.4. Inmunocitoquímica de laminina	47
<b>VI. DISCUSION.</b>	<b>49</b>
6.1. Evaluación motora	49
6.2. Valoración morfológica	50
6.2.1 Neurodegeneración, reactividad glial y vascularización.	50
6.3 Limitaciones y Propuestas	58
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>63</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>64</b>

**ABREVIATURAS**

Amortiguador de fosfatos salino	PBS
Anticuerpo	Ac
Área granular lateral	AGL
Área granular media	AGM
Área somato-sensorial primaria	SI
Decibeles	dB
Diaminobencidina	DAB
Factor de necrosis tumoral alfa	TNF- $\alpha$
Hidróxido de amonio	NH <sub>3</sub> OH
Interleucina 1-beta	IL-1 $\beta$
Interleucina 6	IL-6
Matriz extracelular	MEC
Membrana basal	MB
Micras ó micrómetros	$\mu$ m
Molar	M
Normal	N
Peroxido de hidrógeno	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Proteína ácida fibrilar glial	GFAP
Sistema nervioso central	SNC
Sistema nervioso	SN
Voltio	V
Watts	W



## RESUMEN

**Introducción.** La quitosana en hidrogel ha funcionado como estructura de sostén y medio de comunicación celular en diferentes estudios *in vitro*; perfilándose como biomaterial con excelentes cualidades para favorecer la comunicación nerviosa y atenuar el déficit funcional producido por daños cerebrales. Sin embargo, es necesario evaluar su respuesta *in vivo* en el cerebro lesionado. **Objetivo.** Evaluar el desempeño motor y la respuesta morfológica celular circundante, al implantar quitosana en la corteza cerebral lesionada de ratas adultas. **Metodología.** De 45 ratas machos adultas a 30 se le realizó una lesión por aspiración. A 15 se les implanto quitosana en gel (Q), otras 15 lesionadas se dejaron sin implante (L) y en las 15 restantes se realizó manipulación quirúrgica (M). El sacrificio de estos animales se llevó a cabo a los 3, 14 y 35 días poslesión; posteriormente se fijaron los cerebros para cuantificar el grado de neurodegeneración, el número y morfología de astrocitos y microglia, así como la presencia de laminina (neovascularización). **Resultados.** En la evaluación morfológica resultó un menor número de astrocitos y microglia a los 3 y 14 días de sacrificio en el grupo Q vs. el grupo L. Se observó menor neurodegeneración en los tejidos con implante de quitosana los 3 días; sin embargo, a los 14 la cantidad de neuronas muertas en Q se incremento vs. L; a los 35 días la neurodegeneración es casi nula en este mismo grupo. El análisis de laminina indicativo de neovascularización a los 35 días reveló menor inmunoreactividad en el grupo Q vs. L. Para las comparaciones anteriores, los valores basales fueron obtenidos de las ratas con lesión simulada. **Conclusiones.** La quitosana intracerebral inhibió la gliosis reactiva, pero redujo también la neovascularización. La neurodegeneración sufrió un retraso en la evolución temporal; los daños fueron de menor severidad en presencia del implante de quitosana.

## ABSTRACT

**Introduction.** Chitosan Hydrogels has been successfully utilized in different "in vitro" studies as artificial matrices to structural supporting and to maintain the intracellular communication, as consequence of all the favorable results, chitosan is now considered a promissory biomaterial that could be useful to reduce the severity of functional cerebral deficit after injury. However, it is necessary to analyze the tissue response against chitosan.

**Objective.** Investigate the locomotor function and neuroglial reactivity in the brain of adult rats wounded for aspiration of right cortex, and refilled with chitosan hydrogel.

**Methodology.** 45 mature male rats were utilized, 30 suffered cerebral aspiration wound, only the half of them received the chitosan implant (Q), the other half of rats, the surgical was just sutured without implant, the remaining animals were only sham operated (M), without reach of the meninges. At 24 h postlesion the locomotor ability was evaluated in the equilibrium bar through 14 days. At 3, 14 and 35 postlesion days, groups of 5 rats were sacrificed by perfusion to fixation of its brain, for microscopical analysis of neurons and reactive gliosis around the wounded area. The neurodegenerative index was calculated, the numerical density of astrocyte, microglia and their cytoplasmic complexity were also registered, together with laminine labelling.

**Results.** The wounded rats from Q vs L groups revealed a similar locomotor deficit in the first postlesion days, however, both groups reached a normal qualification on the last three days of this test (14 days). The immunocytochemical analysis at 3 and 14 postlesion days reveal a reduced astrocytic and microglial number in samples of chitosan implanted rats, the cytoplasmic branching of both cellular lineage was also suggestive of beneficial effects of the chitosan implant. Regarding to the neurodegenerative analysis, a delayed death succeeded in the chitosan implanted brains, therefore, there were not significant differences among Q and L groups at 35 days. The laminine analysis showed a reduced labeling in presence of intraparenchymal chitosan at 35 days stage. For all above referred measurements, the sham operated group values were considered basal.

**Conclusion.** There were not evidenced unfavorable effects imputable to the intracerebral chitosan hydrogel, for the opposite, the normal course of locomotive recovery, the attenuated gliosis and the not enhanced neurodegenerative index were all positively interpreted, excepting the decreased laminine detection.

## I. INTRODUCCIÓN.

El deterioro funcional del sistema nervioso es una de las causas más importantes de mortalidad y discapacidad, (Lighthal, Dixon, & Anderson, 1989). Las secuelas de enfermedades del sistema nervioso en su mayoría provocan algún grado de incapacidad permanente, que son la causa de grandes pérdidas económicas y laborales en la población general (McKerracher, 2001). Por ejemplo, se ha registrado que Canadá gasta en promedio 3.9 mil millones de dólares tan solo en el cuidado de los enfermos de Alzheimer (Hsiung, Sadovnick & Feldman, 2004), mientras que en los Estados Unidos de Norte América se gastan hasta 3 mil millones de dólares en la atención primaria de los pacientes con trauma craneoencefálico, sin tomar en cuenta los gastos por su rehabilitación.

Este tipo de trauma es la primera causa de mortalidad e incapacidad de personas en edad productiva en México (Otero-Corona-Vázquez, 1997). Otras causas de incapacidad por daño cerebral son las siguientes: 1) enfermedad vascular cerebral, que tiene una prevalencia en la población mexicana residente de los Estados Unidos de aproximadamente 140,000 casos por año (Gillum, 1995), 2) daño hipóxico-isquémico secundario a paro cardiorrespiratorio (Made & Holzer, 2004), 3) traumatismos abiertos o cerrados, (Lighthal, et al, 1989; Lafuente, & Zarranz, 1998; Duvedev, Roof, Fülöp, Hoffman, & Stein, 1995; Hoffman, Fülöp, & Stein, 1994), 4) manipulación quirúrgica necesaria en la resección de tumores, extracción de un cuerpo extraño, o extirpación de focos epileptogénicos.

En la búsqueda de mejorar la calidad de vida de estos pacientes se han desarrollado numerosos recursos terapéuticos, como la administración de fármacos o compuestos bioactivos, la aplicación de terapia génica, transplantes de tejidos o de células, en muchos de los casos combinados con biomateriales los cuales han adquirido recientemente un mayor impacto (Peppas, & Langer, 1994).

La justificación para el uso de biomateriales en el sistema nervioso radica en aprovechar sus propiedades fisicoquímicas, aunadas a los mecanismos naturales de recuperación cerebral como son la extensión espontánea de neuritas y la compensación funcional por otras áreas del cerebro. Para ello es necesario conocer la biocompatibilidad del biomaterial en el sistema nervioso lesionado y su degradabilidad, que haga posible llegar a integrarse completamente en el tejido receptor.

Pese a los numerosos estudios en los que ha sido utilizada la quitosana, en ninguno de ellos se han analizado sus efectos al aplicarse como hidrogel en el cerebro lesionado, si bien se ha comprobado su afinidad con el tejido nervioso *in vitro* y la estabilidad de estas células *in vivo*, no se ha comprobado aún la respuesta de este tejido ante una situación de lesión. Para ello es necesario conocer la respuesta tisular por la presencia de este biomaterial a corto y mediano plazo. Por lo anteriormente señalado, el propósito principal de este trabajo consistió en evaluar la biocompatibilidad de la quitosana, al estar en contacto con el tejido cerebral lesionado.

## II. ANTECEDENTES

### 1.1. BIOMATERIALES

Se han evaluado los efectos del uso de distintos biomateriales en el tratamiento de enfermedades cerebrales como malformaciones arteriovenosas, aneurismas y tumores en cabeza y cuello (Angelova, 1999; Mattson, & Levin, 1990; Peppas, & Langer, 1994), los resultados favorables obtenidos permiten inferir que ellos ofrecen una gran diversidad de posibles aplicaciones biomédicas (Hubbell, 1990). Por otra parte, existe una relación directa entre el desarrollo de biomateriales y la posibilidad de nuevos tratamientos específicos contra diversas clases de trastornos neurodegenerativos (Tabla 1).

POLIMERO	APLICACIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO
<i>Colágena</i>	Suturas absorbibles, películas hemostáticas, micro-esferas de liberación controlada.
<i>Celulosas</i>	Películas hemostáticas.
<i>Alginato</i>	Micro-cápsulas con sustancias bioactivas para tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.
<i>Quitosana</i>	Sistemas de liberación de factores tróficos, tubulización de nervios periféricos, agente hemostático.
<i>Metilacrilamida</i>	Hidrogeles para la reconstitución del tejido nervioso.
<i>Poli (tetrafluoroetilen) (*Teflón)</i>	Sustituto dural.
<i>Silicona</i>	Tubulización de nervios periféricos.
<i>Gel-Foam</i>	Espuma hemostática.

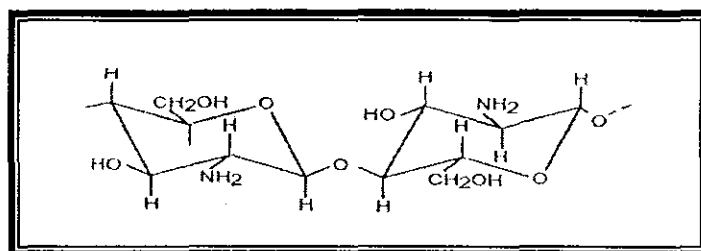
Tabla 1. Diferentes aplicaciones de biomateriales en el SN.

Basado en la tabla de biomateriales de Angelova, (1999).

Los biomateriales pueden estar compuestos por distintas clases de polímeros naturales que ya se utilizan ordinariamente en diferentes aplicaciones clínicas (Angelova, 1999; Peppas & Langer, 1994). Sin embargo, estos deben poseer ciertas características para ser aplicables en la práctica, tales como: permeabilidad, que permita el intercambio de líquidos plasmáticos; características de adhesión célula-polímero; biodegradación lenta, de modo que los residuos puedan ser metabolizados y/o desechados por el organismo; compatibilidad con el mismo y por tanto ausencia de toxicidad (Angelova, 1999; Hubbell, 1990). Dentro de los biomateriales propuestos para estas aplicaciones clínicas destaca la quitosana, debido a sus propiedades físico-químicas y biológicas se le considera uno de los mejores candidatos, especialmente en la regeneración nerviosa (Chandy & Sharma, 1990; Rao & Sharma, 1997).

#### **1.1.1. QUITOSANA (Propiedades y aplicaciones).**

La quitina es un biopolímero de gran abundancia en la naturaleza, está presente en el caparazón de crustáceos (Allan, et al. 1993) y exoesqueleto de diversos insectos, hongos y plantas (Allan, et al. 1993; Süheyla, 1997); sus derivados comúnmente se producen a través de la desacetilación, como la quitosana; constituida por unidades repetidas de  $\alpha$ -(1,4)-2-amino-2-deoxi-D-glucosa (glucosamina) (Allan, et al. 1993; Chandy & Sharma, 1990; Muzzarelli, 1977; Shephard, Reader & Falshaw, 1997; Süheyla, 1997) (Fig. 1), es soluble en pH menor a 6.0 y se precipita con reactivos alcalinos, por su carga positiva (catiónica) se le adhieren moléculas cargadas negativamente (Muzzarelli, 1977; Süheyla, 1997).



**Figura 1. Estructura química de la quitosana.**

Se observan dos grupos glucosamina unidos, la unión de muchos monómeros de glucosamina forma cadenas repetidas que constituyen la quitosana.

La viscosidad y peso molecular de la quitosana son función inversa de su grado de desacetilación, propiedad que puede variarse de acuerdo al procedimiento de obtención, o por los tratamientos físicos o químicos a los que se somete (Muzzarelli, 1977).

Al entrar en contacto con tejidos vivos la quitosana se vuelve gradualmente inestable, esto permite su biodegradación mediante fragmentación y absorción sin dejar residuos (Jayakrishnan & Jameela, 1995; Jameela, Kumary, Lal & Jayakrishnan, 1998; Lee, Ka & Park, 1995; Onishi & Machida, 1999; Tohimada & Ikada, 1997), esta propiedad se puede atribuir a su contenido nitrogenado (Allan et al, 1993), que facilita la acción de lisozimas y quitinasas (Escott & Adams, 1995; Muzzarelli, 1996). Hasta este momento no se han evidenciado manifestaciones de toxicidad o rechazo. Además de su gran compatibilidad con los tejidos (Lee, Ka, & Park, 1995), también se ha observado que la quitosana posee actividad antibacteriana (Tsai & Su, 1999), probablemente debido al

entrecruzamiento que existe entre la superficie catiónica y los aniones presentes en la pared bacteriana, por lo que se afecta la permeabilidad de la misma.

Existen numerosas aplicaciones para la quitosana, (Muzzarelli, 1977; Süheyla, 1997) entre ellas algunas biomédicas, por ejemplo: como vehículo para liberación prolongada y controlada (micro-esferas) de diversos compuestos (Chandy, Das, & Rao, 2000; He, Davis, & Illum, 1999; Jameela et al, 1998; Mi, Shyu, Chen & Schoung, 1990) o como bio-adhesivo entre otras. (Needleman, Martin & Smales, 1998).

Es utilizada para fabricar membranas artificiales, con las que se producen matrices para el sostén de tejidos parenquimatosos (riñones e hígado) (Elçin, Dixit, & Gitnick, 1998; Muzzarelli, 1977), en las que se ha probado la adhesión celular y la actividad metabólica de los hepatocitos mediante estudios *in vitro* (Chung, Yang, Akaike, Cho, Nah, Kim & Cho, 2002); también se ha utilizado quitosana en sustitución de tejidos de gran resistencia como hueso, combinándola con compuestos de gran dureza como la hidroxiapatita; (Wan, Knor & Hastings, 1997), en esta misma línea se ha observado que la propiedad catiónica de la quitosana acelera la cicatrización de la piel, (Ishihara et al, 2002) y formación de hueso (Klokkevold, Lew, Ellis & Bertoami, 1992; Muzzarelli, 1993). Ishihara et al (2002) utilizaron hidrogel de quitosana en piel a los 2 días poslesión y lograron acelerar la cicatrización hasta un 50%, además de otros trabajo demostrando sus efectos benéficos sobre injertos de piel (Stone, Wright, Clarke, Powell, & Devaraj, 2000).



Existen varias estrategias para favorecer la reparación del tejido nervioso, por ejemplo, la aplicación de biomateriales que actualmente se utilizan en la práctica clínica. La ingeniería química ha desarrollado bio-polímeros en forma de hidrogel con una estructura porosa que permite la migración celular dentro del mismo, haciendo de esta estructura el andamiaje ideal para lograr la reconstitución del tejido, un ejemplo es el hidrogel elaborado por Woerly et al, (1999), el cual permite o mantiene la comunicación de los dos extremos del tejido nervioso. Por esta razón, los biomateriales utilizados de esta manera se convirtieron en la forma más aplicada para lograr comunicación intercelular en espacios vacíos, como medios para la administración de factores tróficos (Berezovskaya, Maysinger & Fedoroff, 1996), o para el trasplante de células madre o embrionarias (Teng Lavik, Quo, et al, 2000).

Schmidt et al (1997), al aplicar corriente eléctrica *in vitro* a un polímero de ácido pirrólico observaron un incremento en la proliferación y la extensión de ramificaciones en células PC12, esto sugiere que la carga eléctrica es un factor determinante para lograr la prolongación de ramificaciones, que a su vez facilita la comunicación y reconexión en el tejido nervioso lesionado, sin embargo, estos procesos dependen del mantenimiento de la corriente positiva lo que dificultaría su aplicación *in situ*, resultaría mas efectivo si el polímero tuviese su propia carga. Dillon et al (1998), desarrollaron un modelo *in vitro*, en el cual elaboraron un hidrogel con varios compuestos entre ellos se encuentra la quitosana, cuya particularidad es poseer carga eléctrica positiva, con este modelo demostraron que se facilitó el crecimiento axónico. Haipeg et al (2000), desarrollaron una estructura tridimensional a base de hidrogel de quitosana y otros polímeros, en este se logró la reconexión

nerviosa en un cultivo de células cerebrales y de gliosarcoma. En un estudio realizado por Elçin et al (1998), encontraron que la aplicación de quitosana como substrato para el trasplante celular, en médula espinal de ratas, mejoró la adhesión de las células a la misma y permitió una mayor supervivencia celular embrionaria a los 14 días pos-trasplante en comparación con otros tipos de polímeros.

Por otro lado, también se ha utilizado la quitosana en el sistema nervioso periférico como cámara para el crecimiento axónico del nervio ciático seccionado. Estos tubos se han elaborado usando diferentes técnicas y conjugando la quitosana con otros biomateriales como la apatita, ácido poliglicólico ó colágena, habiendo obtenido en todos los casos resultados muy favorables para facilitar la regeneración nerviosa (Wan, et al, 1997). También se ha utilizado la quitosana asociada con factores de crecimiento (factores de regeneración nerviosa, factor de crecimiento nervioso), hormonas como progesterona y laminina. En nuestro laboratorio, la tubulización del nervio ciático seccionado de ratas con quitosana y progesterona en su interior, favoreció la recuperación de hasta un 80 % del nervio (Gómez-Pinedo et al, 2001). En otros trabajos realizados en nuestros laboratorio podemos mencionar el siguiente en el que se realizó un estudio de prótesis de quitosana cargado con progesterona y otras hormonas en el nervio seccionado de conejos en el que encontramos tejido nuevo constituido por células de schwann y fibras nerviosas organizadas en patrón incipiente. (Chávez-Delgado, Mora-Galindo, Gómez-Pinedo, Feria-Velasco, Castro-Castañeda, López-Dellamary Toral, et al, 2003; Chávez-Delgado, Gómez-Pinedo, Feria-Velasco, Huerta-Viera, Castro-Castañeda, López-Dellamary Toral, et al, 2005)

Los estudios sobre quitosana intracerebral no son nuevos, el primero fue realizado por Brandenburg et al (1984) para facilitar la hemostasis en un modelo de lesión cerebral en gatos, al aplicar la quitosana no se produjeron signos necróticos inflamatorios manteniendo la integridad del tejido. La ventana temporal de aplicación en este estudio fue muy breve (minutos), por lo que no fue posible evaluar los efectos por la presencia intracerebral de este biomaterial.

En trabajos más recientes se han diseñado hidrogeles para crear matrices de sostén, utilizando quitosana como su componente principal, mezclada con colágena, polilisina, gelatina, lectina, etc., debido a que incrementan la afinidad celular, estos compuestos se han utilizado como piel artificial, para facilitar el crecimiento de huesos y la recuperación de cartilago (Kratz, Arnander, Swedenborg, Back, Falk, Gouda et al, 2000; Okamoto, Watanabe, Miyatake, Morimoto, Shigemasa & Minami, 2001; Wein, Lao & Gu, 2001). También se ha buscado diseñar hidrogeles con afinidad para el tejido nervioso; el estudio más cercano ha sido un hidrogel desarrollado a base de quitosana, en el que se agregó colágena para desarrollar piel artificial, útil en quemaduras de 3er y 4to grado; el estudio se enfocó en la regeneración de la piel y terminales nerviosas, al favorecer el crecimiento nervioso (Ishihara et al, 2002).

También se estudió la biocompatibilidad de este tipo de estructura altamente porosa con tejidos no inflamados, o con inflamación leve o ausente, resultando una buena tolerabilidad hacia la quitosana, separadamente se analizó la tolerancia *in vivo* de piel de ratones para quitosana (Gingras, Paradis & Berthod, 2003), se valoró el crecimiento

de células de tipo nervioso en el gel de quitosana, resultando buena estabilidad celular y compatibilidad subcutánea.

## 1.2. MODELOS DE LESIÓN CEREBRAL

La rata es el animal más comúnmente utilizado para desarrollar modelos de lesión debido a su simplicidad anatómica y accesibilidad quirúrgica, (Lafuente & Zarranz, 1998; Zilles, 1990), con ella se han ensayado diversos recursos terapéuticos; por otro lado, los diferentes tipos de lesiones practicadas en ratas han permitido determinar muchas de las funciones cerebrales de la corteza sensorio-motora localizada en las áreas fronto-parietales (Neafsey, 1990; Zilles, 1990). Esta corteza se divide en 5 regiones principales: área agranular medial (AGM), área agranular lateral (AGL), somato-sensorial granular primaria (SI), somato-sensorial granular secundaria (SII) y corteza insular (Neafsey, 1990), (Fig. 2).

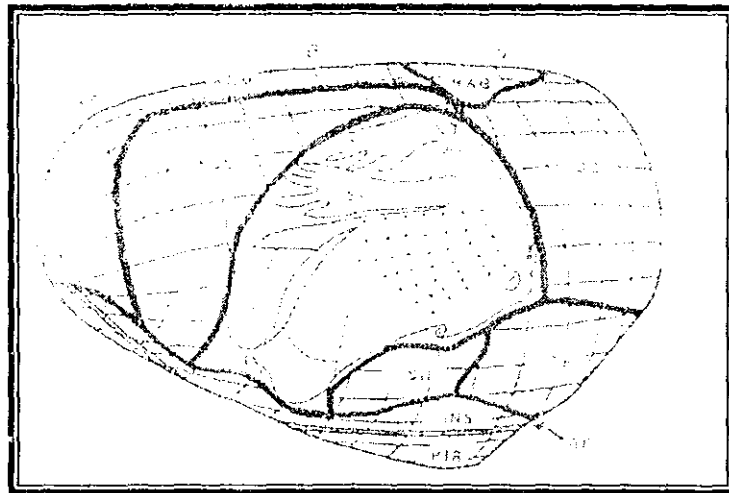


Figura 2. Ratúnculo sensorio-motor. AGM, área agranular medial; RAG, área retroesplénica agranular; AGL, área agranular lateral; OC, área occipital visual; SI, área granular somatosensorial

primaria; **SII**, área granular somatosensorial secundaria; **TE**, área temporal auditiva; **INS**, área insular; **PIR**, corteza piriforme; **RF** fisura rinal. (Tomado de Kolb 1990).

La zona motora de la extremidades anteriores y posteriores se localiza tanto en AGL como en SI, el borde entre ambas es la división entre corteza motora primaria (representación somático-motora) y corteza sensorial primaria, (representación somático-sensorial) (Neafsey, 1990). Debido a las interconexiones entre las cortezas frontal y parietal, se requieren ambas en la función motora de ambas extremidades (Zilles, 1990).

### 1.2.1. MODELOS DE LESIÓN CEREBRAL EN RATA

Los modelos más comunes son: traumatismo por contusión (Hoffman et al, 1994), consiste en aplicar una fuerza mecánica directamente sobre el cráneo, o al cerebro; (Mattson & Levin, 1990; Pravdenkova, Basnakian, James & Andersen, 1996); isquemia, (Burns, 1998) producida por embolismo arterial (González- Pérez et al, 2002), o ligadura de la arteria cerebral media; (Abraham & Lazar, 2000; Rogers & Hunter, 1996), herida penetrante; (García-Estrada et al, 1999) y aspiración del tejido cerebral, (Feeney et al, 1982; Kikuchi, Nishino, Ohyu, 2000).

Los dos primeros modelos tienen la desventaja de no provocar la pérdida física del tejido cerebral al momento de la lesión (Jorgensen et al, 1997; Burns, 1998), lo que dificulta la aplicación de algún biomaterial. Por otra parte, la herida resultante por una lesión penetrante al deslizar una cánula a lo largo del cerebro, tampoco produce la

remoción del tejido (García-Estrada et al, 1999); de tal manera que ninguno de estos modelos son útiles para el propósito de este estudio.

Por el contrario, en la lesión por aspiración se provoca la pérdida controlada de tejido cerebral, además la lesión puede delimitarse de manera precisa y es fácilmente reproducible, (Feeney et al,1982; Kikuchi et al, 2000) por ello se seleccionó este modelo para evaluar los efectos de la quitosana en el parénquima cerebral, además este procedimiento reproduce las condiciones en las cuales la quitosana tendría su aplicación clínica, por ejemplo en las intervenciones quirúrgicas para la remoción de cuerpos extraños o en la extirpación de tumores cerebrales o focos epilépticos, incluso frente a cualquier daño cerebral, ya sea invasivo o no.

Este tipo de lesión provoca principalmente edema inflamatorio no vasogénico, hipoxia e hipoglucemia, (Jacobson, 1972; Lafuente & Zarranz, 1998; Krieglstein, 1997) acompañados de necrosis neuronal en la zona afectada, de lo que resulta una disfunción en dicha área. Por otro lado, la zona cerebral que mas comúnmente se lesiona mediante este modelo es la que comprende las funciones sensorio-motora de las extremidades. Una de las ventajas que ofrece la pérdida de esta función es la evaluación de tratamiento terapéuticos y/o baterías conductuales, esto debido a que se visualiza de manera sencilla la pérdida y recuperación de la función.

### **1.3. PROGRESIÓN DEL DAÑO CEREBRAL**

Frente a lesiones por aspiración se produce pérdida evidente de tejido cerebral y el consecuente espacio vacío, así como la rotura de la barrera hematoencefálica,

extravasación de sangre, junto al acarreo de células y componentes inflamatorios en el área lesionada para producir finalmente el edema (Jorgensen et al, 1997). Estos eventos corresponden a los fenómenos de la inflamación aguda, la cual además se acompaña de infiltración de neutrófilos, estos liberan radicales libres de oxígeno y proteasas que incrementan el daño en el tejido circundante (Robbins, 1998; Speziale, 1991).

Posteriormente el sitio de lesión pasa a la fase crónica, caracterizada por aumento del número de macrófagos, linfocitos y eosinófilos (Speziale, 1991). Los macrófagos se encargan de fagocitar los desechos celulares y neutrófilos degenerados, además favorecen el proceso de cicatrización y reparación mediante liberación de citocinas que activan a los astrocitos. (Robbins, 1998; Speziale, 1990) Estos fenómenos pueden durar algunos días o extenderse por semanas o meses, dependiendo de la evolución de la lesión (Robbins, 1998).

### 1.3.1. MUERTE NEURONAL

Como se describió antes, los procesos inflamatorios provocan la muerte de las neuronas, por ejemplo: necrosis, (Burns, 1998; Jacobson, 1972) causada por el incremento de  $Ca^{++}$  intracelular que origina una cascada de procesos bioquímicos como: liberación de proteasas y endonucleasas (responsables de la disgregación del citoesqueleto) (Lafuente & Zarranz, 1998) retracción, fragmentación nuclear o cariólisis, además de cromatólisis central acompañada por la disolución de la sustancia de Nissl (retículo endoplásmico rugoso) debido a la acción de las lipasas liberadas, e

inflamación del cuerpo neuronal (Bovolenta et al, 1991; Burns, 1998). También se producen distrofias neuro-axonales, provocando la muerte neuronal retrograda (Stichel & Müller, 1998). A pesar de que las distrofias axonales pueden ser reversibles, llegan a activar mecanismos apoptóticos (Bovolenta et al, 1991; Riva-Deputy et al, 1994; Sato et al, 2001; Stichel & Müller, 1998).

Por otra parte, la presencia de neurodegeneración por la tinción con hematoxilina/eosina revela neuronas con signos de picnocitosis, cariorrexis, cariólisis, eosinofilia citoplasmática o pérdida de la afinidad por la hematoxilina; también aparecen otras alteraciones celulares como neuronas oscuras, festonadas y edematizadas (García et al, 1995).

### 1.3.2. REACTIVIDAD GLIAL

**Microglia.** Los cambios tisulares mencionados se presentan aproximadamente a los 3-4 días después del daño y pueden prolongarse alrededor de dos semanas. Si bien, las células de microglia son las primeras que se activan, se desconoce el mecanismo que inicia su activación, se cree que está mediado por eventos necróticos (Stoll & Jander, 1999; Stoll et al, 1998; Streit et al, 1997); sin embargo, existen estudios que sugieren que la necrosis neuronal no es necesaria para la activación microglial, más bien se requieren eventos más sutiles por ejemplo, cambios en la concentración de algunos iones o proteínas plasmáticas (Stoll & Jander, 1999).



De cualquier modo la microglia sufre un proceso de transformación y proliferación desde las primeras 24 a 72 h (aunque se observan células transformadas aún a los 14 días poslesión) (Streit et al, 1997). Su activación comienza con retracción y engrosamiento de sus prolongaciones y aumento del cuerpo celular, posteriormente pierden sus prolongaciones y adoptan una forma ameboidea, tipo macrófago (etapa fagocítica) (Riva-Depaty et al, 1994; Marty, Dussart & Peschanski, 1991; Stoll et al, 1998; Streit et al, 1997).

Este proceso se acompaña por proliferación y migración de las células al sitio de lesión, al mismo tiempo expresan marcadores típicos de su estado activo como CR3 (Cd 45↓-Cd 11b) (Stoll & Jander, 1999; Stoll et al, 1998), además de expresar MHC I y II en bajos niveles, por lo que la microglia parenquimal no se considera presentadora de antígenos (Stoll et al, 1998), posteriormente liberan citocinas pro-inflamatorias como interleucina-1 $\beta$  (IL-1), interleucina-6 (IL-6) el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) etc. (Banati et al, 1993; Frei et al, 1987; Merrill, 1992; Riva-Depaty et al, 1994; Stichel & Müller, 1998; Streit et al, 1997), estos compuestos provocan reacciones tisulares que van desde la proliferación y aumento de la adhesión celular, hasta citotoxicidad directa sobre los tejidos circundantes.

La actividad microglial se incrementa al dañarse la barrera hematoencefálica, que permite la infiltración de macrófagos y linfocitos, iniciándose la respuesta inflamatoria (Frei et al, 1987; Gerhmann et al, 1995; Marty et al, 1991). La microglia puede liberar tanto factores tróficos como citotóxicos, por ejemplo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cotton & Gilbert, 1987), oxido nítrico y proteinasas lisosomales, resultando muerte neuronal por apoptosis (Riva-

Depaty et al, 1994). Además de encabezar la respuesta inmune celular primaria ante una lesión del tejido nervioso, la microglia es capaz de activar a los astrocitos (Stichel & Müller, 1998; Stoll & Jander, 1999). La activación de la microglia y de los astrocitos aparentemente presenta una secuencia temporal coordinada, es decir; a medida que proliferan y se activan los astrocitos, disminuye la respuesta de microglia (Gerhmann et al, 1995; Jensen et al, 1994).

**Astroцитos.** Intervienen activamente en los procesos de reparación y cicatrización, además de circunscribir la zona de daño, y favorecer el restablecimiento de la barrera hematoencefálica (García-Estrada et al, 1999; Luquín, 1995; Topp et al, 1989; Vazquez-Chona & Geisert, 1999). La formación de dicha cicatriz es muy variable (Bignami & Dahl, 1976; Geisert & Stewart, 1991) dependiendo del tipo de daño; sin embargo, en la mayoría de las lesiones sigue más o menos la misma secuencia (Merril, 1992).

Inmediatamente después de la lesión, sufren incapacidad reversible para regular el exceso de potasio extracelular, lo que conlleva a lesión secundaria de las neuronas circundantes; la lesión a la barrera hematoencefálica permite el contacto del astrocito con proteínas plasmáticas (Sandving et al, 2004), específicamente la albúmina, alterando la expresión de los receptores de calcio, lo cual pudiera relacionarse con la activación de factores neurotróficos dependientes del mismo (Silver & Miller, 2004).

La cicatriz glial crea una barrera física y bioquímica, la cual no pueden atravesar los axones, cuando se trata de una lesión que respeta las meninges, la cicatriz glial se compone principalmente por astrocitos y proteoglicanos, cuando esto no ocurre, las

meninges se ven mezcladas con tejido conectivo que invade el trayecto de la lesión (Sandving et al, 2004).

Al igual que la microglia, los astrocitos atraviesan por un proceso de transformación y proliferación, mediados o modulados por mecanismos inflamatorios, en los que se cree que la IL-1 participa activamente (Fagan & Gage, 1994; Stoll et al, 1998). Durante estos eventos se incrementa la expresión y síntesis de proteínas, como la proteína acídica fibrilar glial (GFAP) (Eng & Shiurba, 1988; Hozumi et al, 1990; Weinstein et al, 1991), que se expresa a bajos niveles en condiciones normales, esta proteína contribuye a la transformación de los astrocitos (Bignami & Dahl, 1976; Fawcett & Ascher, 1999).

Se ha observado que los astrocitos expresan además otro tipo de moléculas, que pueden impedir el crecimiento y alargamiento axonal, por ejemplo: brevicam, neurocam o NG2, mediados por citocinas inflamatorias (Fawcett & Ascher, 1999). La neuroproteína glial 2 (NG2) es una proteína de membrana astrocitaria que inhibe el crecimiento axonal y su concentración se ve aumentada durante los primeros 7 días posteriores a una lesión, considerándose el inhibidor más potente del proceso agudo de reparación cerebral (Fidler et al, 1999) los mecanismos restaurativos posteriores a la lesión pueden iniciarse desde las primeras dos semanas y persistir hasta varios meses, incluso años (Eng & Shiurba, 1988; Fagan & Gage, 1994; Stichel & Müller, 1998; Stoll et al, 1998).

**Proteínas de la Membrana Basal.** Después de que se produce la cicatriz glial, se acumulan los depósitos de colágena (Bovolenta et al, 1991; Sakiyama, Schensen & Hubell,

1999). Por otro lado, los astrocitos producen una gran cantidad de glucoproteínas como colágena, fibronectina y laminina (Bovolenta et al, 1991; Stichel & Müller, 1998). Estos compuestos constituyen la membrana basal (MB), aunque también participan como elementos de unión junto con moléculas de la matriz extracelular (MEC), ya que están presentes en sitios de unión celular (Bovolenta et al, 1991; Sakiyama et al, 1999; Timpl, 1989; Yamada, 1999).

Tanto la laminina como la colágena IV forman parte de la glia limitante (Stichel & Müller, 1998), esta última además, juega un papel importante durante el desarrollo embrionario y en los procesos de reparación (Bovolenta et al, 1991). La laminina, por su parte, es reconocida por receptores tipo integrina (Yanaka, Camarata, Spellman, Skubitz, Furcht & Low, 1997), presenta propiedades adhesivas y es necesaria para la polarización de células epiteliales, en la formación y mantenimiento de los vasos sanguíneos, también juega un papel muy importante para mantener la integridad neuronal (Manthorpe, Engvall, Ruoslahti, et al, 1983). Por otro lado, se ha observado que la reconexión del tejido nervioso está precedida de la neovascularización, teniendo a la laminina como elemento principal (Stichel & Müller, 1998).

El proceso de reparación y remodelación del tejido nervioso dañado, está mediado por la interacción de los elementos de la MB, moléculas de la MEC y matrices de proteasas, formándose así la cicatriz (Stichel & Müller, 1998). Las células gliales participan activamente en este evento, ya que en sus membranas expresan los receptores para integrinas (Stichel & Müller, 1998; Yamada, 1999) (elementos de adhesión) y producen también componentes, tanto de MEC como de la MB (Fagan & Gage, 1994; Fawcett & Ascher, 1999). Dado que el proceso de reparación lleva bastante tiempo

(semanas-años), los depósitos de colágena (Stichel & Müller, 1998) aunados a la cicatriz glial, forman una barrera física que impide un alargamiento axonal exitoso (Fawcett & Ascher, 1999; Stichel & Müller, 1998).

Todos estos procesos resultantes de lesiones como las que se mencionaron al inicio de esta sección, se manejan con diferentes estrategias reconstructivas, unas de tipo quirúrgico y otras mediante el uso de fármacos, sin embargo existe otra estrategia terapéutica que comienza a desarrollarse, el uso de biomateriales, los cuales facilitarían la reestructuración del tejido dañado.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tejido nervioso adulto posee una capacidad limitada para regenerarse. Existen diferentes mecanismos restaurativos que permiten recuperar parcialmente las funciones nerviosas afectadas. Para favorecer estos procesos de plasticidad frente a una lesión se han utilizado biomateriales, destacando entre ellos la quitosana. Dada su propiedad catiónica parece favorecer la reconexión axonal, por lo que ha sido utilizada de distintas maneras en tejido nervioso, sin embargo, no se conoce el efecto que ésta pueda tener en el cerebro adulto lesionado cuando se aplica por un tiempo prolongado en forma de hidrogel. Esta presentación física desarrollada con otros biomateriales, ha resultado un buen recurso para facilitar la incorporación del tejido al biomaterial, al actuar como sustrato para adhesión celular. Por lo anterior, el objetivo principal de este estudio consistió en analizar los efectos del hidrogel de quitosana, implantado en la corteza cerebral de ratas adultas lesionadas por aspiración, mediante cuantificación de reactividad glial, pérdida neuronal y neovascularización del área lesionada. De resultar favorable la presencia intracerebral de la quitosana y la ausencia de manifestaciones de rechazo, será propuesta su aplicación como un recurso terapéutico alternativo que favorezca la reorganización del tejido nervioso adulto lesionado, independientemente de muchas otras aplicaciones potenciales.

## OBJETIVOS

### **GENERAL.**

Determinar los efectos de la quitosana como relleno de la cavidad resultante por aspiración en la corteza cerebral de ratas adultas.

### **PARTICULARES.**

3.1. Evaluar la ejecución motora en la barra de equilibrio, de las ratas lesionadas por aspiración durante los días 1-14 poslesión.

3.2. Analizar los efectos de quitosana intracerebral sobre supervivencia neuronal y reactividad de astrocitos y células de microglia en la corteza cerebral lesionada, a los 3, 14 y 35 días poslesión.

3.3. Identificar la presencia de laminina, indicativa de neovascularización en la zona dañada de corteza cerebral, a los 35 días poslesión.

## HIPÓTESIS

El implante de quitosana en hidrogel, tras lesión por aspiración de la corteza fronto-parietal de ratas adultas reducirá el déficit motor y favorecerá la reorganización tisular al estimular la neovascularización, disminuir la muerte neuronal y la reactividad glial.

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 4.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Se utilizaron 45 ratas machos adultas, de la cepa *Swiss-Wistar* con 250-350 g de peso, se mantuvieron en condiciones de bioterio durante todo el estudio; alojadas en grupos de cinco, en cajas de policarbonato con cama de aserrín, ciclos de 12:12 h. luz/oscuridad, temperatura de  $22 \pm 2$  °C con 70% de humedad ambiental, agua potable y alimentación balanceada *ad libitum*.

#### 4.1.1. GRUPOS DE ESTUDIO:

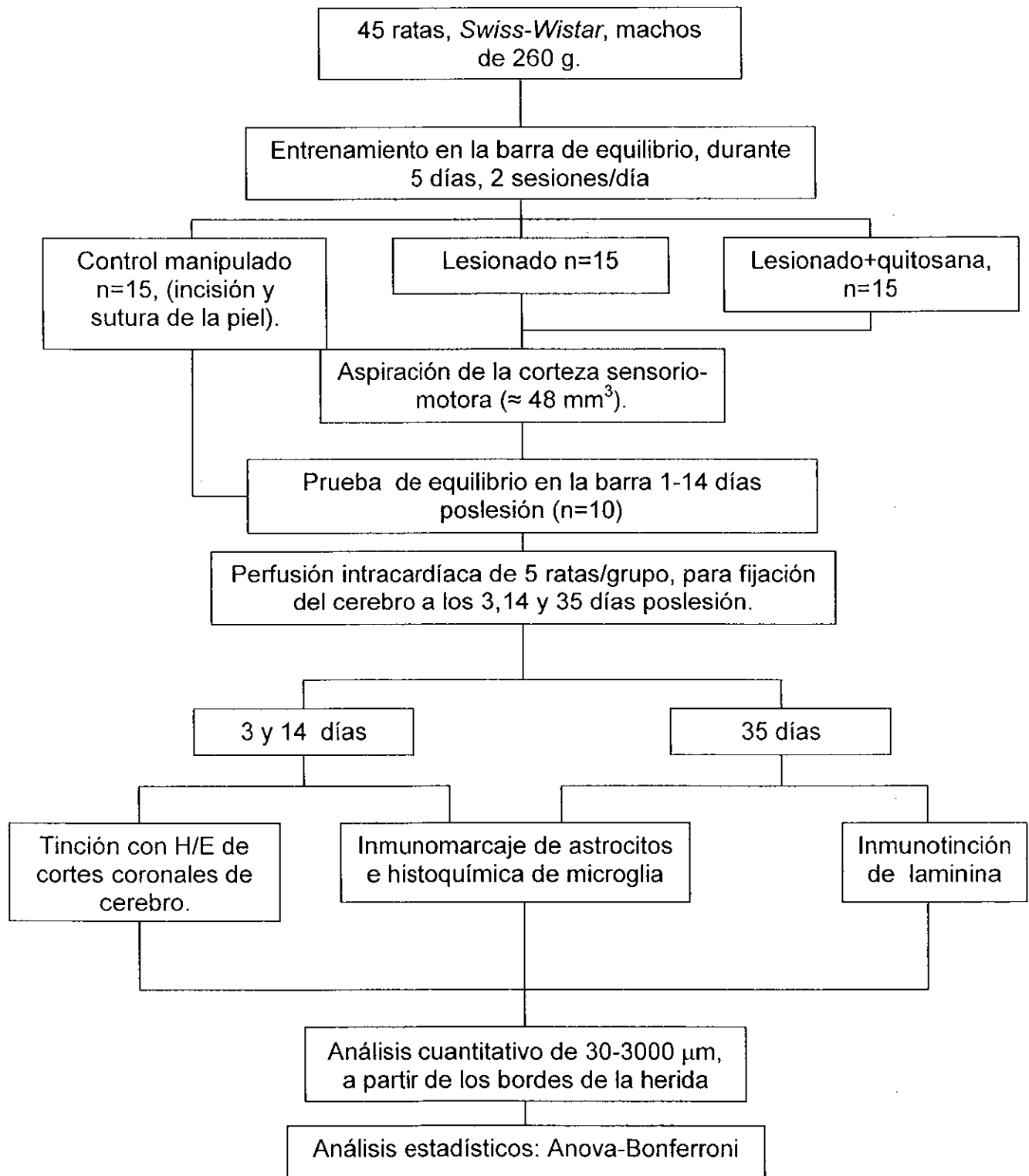
**1. Control-manipulado:** La manipulación consistió en anestésiar a los animales, incidir y suturar la piel del cráneo a largo de la sutura media, para evaluar las consecuencias de la anestesia y de la primera parte del abordaje quirúrgico, sobre los parámetros evaluados.

**2. Lesionado:** Se hizo una lesión por aspiración de la corteza sensitiva-motora y se procedió a suturar -sin aplicar quitosana, para analizar la respuesta tisular a la lesión.

**3. Lesionado + quitosana:** Se practicó la misma lesión, solo que la cavidad resultante se rellenó con hidrogel de quitosana, que se contuvo con una lámina rígida epidural de quitosana, a manera de sello. Este grupo permitió establecer los efectos por la presencia intraparenquimal de quitosana sobre la respuesta del tejido cerebral dañado, y el déficit motor resultante.



## DISEÑO EXPERIMENTAL



Antes de practicar la cirugía se hizo desinfección del área de quirófano con benzaldehído, la lesión se produjo bajo condiciones semi-estériles, teniendo cuidado de que los animales se encontraran completamente anestesiados, y cuando se sacrificaron 5 ratas de cada grupo a los 3, 14 y 35 días poslesión, la dosis anestésica fue subletal. Todos estos procedimientos fueron seguidos de acuerdo a los lineamientos de ética para el uso y cuidados de animales de experimentación del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS.

## **4.2. PREPARACIÓN DE LA QUITOSANA.**

Se adquirió quitosana ultra-purificada de grado biomédico en la forma de hojuelas (Vanson, USA), con porcentaje de desacetilación del 80.8 %, peso molecular de 358 kD, y contenido de proteínas de 191 ppm.

### **4.2.1 LÁMINA Y GEL DE QUITOSANA PARA LA HERIDA CEREBRAL.**

Se preparó una lámina semi-rígida de quitosana para contener el hidrogel de quitosana, utilizado como relleno de la cavidad resultante tras la lesión por aspiración. Para elaborar la lamina la quitosana se disolvió al 3% en una solución acuosa de ácido acético al 2% y se vertió sobre una caja de Petri de 1 cm de fondo por 5 cm de diámetro, hasta alcanzar una altura de 2 mm, se dejó secar a 37 °C durante 24 h, la lamina resultante se desprendió de la caja, se precipitó en una solución acuosa de hidróxido de amonio al 15 %, se dejó secar nuevamente durante 1 h a temperatura ambiente, se lavó con alcohol al 50% durante 15 min para eliminar

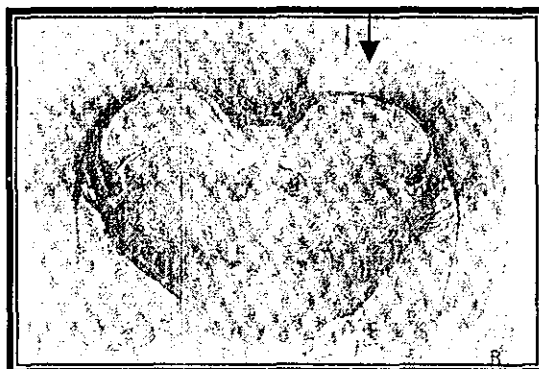
los restos de ácido acético y amoniaco, y se hicieron lavados en agua bidestilada (5x10 min).

Para preparar el gel se disolvió la quitosana (3%) en una solución acuosa de ácido acético al 2%, se vertió en una caja de Petri (1x5 cm) hasta una altura de 2 mm y se introdujo en una estufa a 37 °C durante 2 h para deshidratarle parcialmente y conferirle mayor consistencia. Luego se precipitó en una solución acuosa de hidróxido de amonio al 15 %, se dejó secar nuevamente durante 1 h a 35 °C y se hicieron lavados con alcohol 50° durante 15 min, para eliminar restos del NH<sub>2</sub>OH y ácido acético, finalmente se hicieron lavados mediante cambios en agua bidestilada (5x10 min). Tanto la lamina como el gel se recortaron de acuerdo al tamaño de la lesión y fueron esterilizados en cámara de gas (óxido de etileno).

#### **4.3. CIRUGÍA ESTEREOTAXICA PARA LESIÓN POR ASPIRACIÓN.**

Los animales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal (ip) de pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso) y se les afeitó el dorso de la cabeza, antes de fijarla en un aparato estereotáxico *Stoelting*, se posicionaron las barras auditivas y la de incisivos (-3.3 mm), para inmovilizar la cabeza de la rata en posición completamente horizontal, luego se hizo una incisión en la piel del cráneo por la línea media, desde la comisura posterior de los ojos hasta nivel de las orejas, lateralmente se separaron el tejido conectivo subcutáneo y el periostio, partiendo desde la línea media hacia los lados para descubrir las suturas óseas de bregma (anterior) y lambda (posterior), y registrar las coordenadas iniciales de posición; antero-posterior, medio-lateral y

dorso-ventral. A partir de éstas se definió la zona cerebral donde se hizo aspiración de la corteza cerebral: 2 mm anterior a bregma, 4 mm posterior a bregma, 1mm medio-lateral derecho a partir de la sutura media, hasta 5 mm, (Kikuchi et al, 2000). Durante la trepanación se tuvo especial cuidado en conservar frío el tejido óseo para evitar necrosis por fricción con la fresa del taladro, para ello se humedeció constantemente el hueso con solución salina isotónica a punto de congelación. Se retiró el hueso para visualizar la duramadre y en ella se practicó un corte en "U" para desplazar el colgajo rostralmente y exponer la superficie cerebral. Utilizando una pipeta Pasteur de 0.8 mm de diámetro interno con la punta redondeada, se aplicó una fuerza de vacío de 4.0 libras, para aspirar los tejidos blandos por debajo de la trepanación ósea, hasta visualizar las fibras del cuerpo calloso, que aparecieron de un color blanco refringente a la luz, (sustancia blanca) **(Fig. 3)**. Se hizo hemostasia aplicando solución salina isotónica fría y con gasa húmeda se limpió la zona de la herida para visualizar sus límites. En el primer grupo de animales; en los que no se implantó con quitosana la cavidad en la corteza cerebral resultante de la aspiración, se devolvió a su posición el colgajo dural, se suturó con puntos separados con seda 3 ceros, los animales se colocaron sobre una manta tibia a 37°C, y una vez recuperados se reintegraron a sus condiciones habituales de mantenimiento.



**Figura 3.** Vista coronal de la zona de lesión (Tomada de Kikuchi, et al, 2000).

Para el segundo grupo de animales se siguió este mismo procedimiento quirúrgico, solo que en ellos se aplicó el gel de quitosana en la zona de lesión y por debajo del hueso craneal y sobre la duramadre, se colocó la lámina rectangular semirígida de quitosana previamente descrita, (Fig. 4).

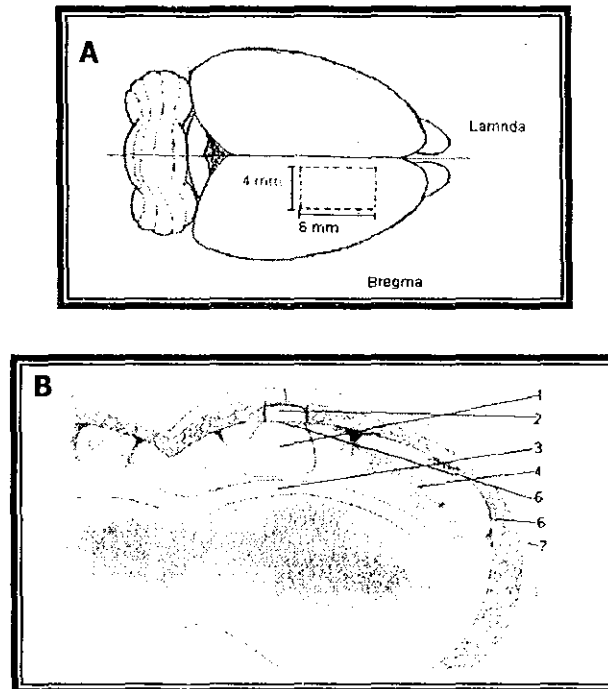


Fig. 4. Diagrama de lesión con quitosana en una vista dorsal del cerebro y en un corte coronal: A) Muestra la posición, forma y tamaño de la zona de lesión, y B) Ubicación del gel de quitosana y la lámina rígida en la zona de lesión: 1. Gel de quitosana, 2. Lámina de quitosana (se muestra con volumen para distinguirla), 3. Cuerpo Caloso, 4. Corteza cerebral, 5. Duramadre, 6. Hueso, 7. Piel.

#### 4.4 PRUEBA DE EQUILIBRIO EN BARRA.

Se evaluó el déficit motor postoperatorio provocado por la lesión en las primeras 24 h, con el propósito principal de corroborar la reproducibilidad de este modelo respecto a la precisión del área lesionada y efectos debidos a la presencia intraparenquimal de quitosana, para ello se utilizó una barra de madera (2.4 cm de

ancho x 122 cm de largo) a una altura de 40 cm, al final de la barra se encontraba una caja oscura de 25x20x18 cm la cual sirvió como resguardo para que la rata escapara de los reforzadores negativos una luz brillante y aversiva producida por una bombilla incandescente de 160 W y un ruido blanco de 62 dB proveniente de un generador de sonido (Kikuchi et al, 2000). Todas las ratas antes de lesionarse se entrenaron durante 5 días dos veces al día, para ello se colocaron sobre un extremo de la barra, se aplicaron los reforzadores y atravesando la barra alcanzaron la plataforma de resguardo, en ese momento se apagó el sonido y la luz. 24 h después de la lesión se repitió el procedimiento y se calificó su desempeño de acuerdo a una escala de 7 puntos descrita por Feeney (Feeney et al, 1982). La calificación fue de 7 si la rata atravesaba toda la barra con un máximo de dos resbalones de la pata, de 6 si utilizó la pata afectada para apoyarse más del 50% de los pasos para atravesar la barra, de 5 si la utilizó menos del 50%, de 4 si atravesó la barra y apoyó al menos una vez la pata afectada, de 3 si atravesó la barra arrastrando la pata afectada, de 2 si fue incapaz de atravesar la barra, pero pudo mantener el equilibrio en ella con las cuatro patas, de 1 si fue incapaz de atravesar la barra y ni siquiera apoyó la extremidad afectada. El registro de estas variables fue llevada a cabo por un observador cegado a la asignación del grupo.

#### 4.4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LA CONDUCTA MOTORA

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar. Se realizó una comparación de medias mediante la prueba estadística t de student. El nivel de confianza de los

datos se estableció en el 95%, se definió el valor de  $p < 0.05$  para considerar significativas las diferencias.

#### **4.5. FIJACIÓN DE LOS TEJIDOS.**

##### **4.5.1. PERFUSIÓN INTRACARDÍACA.**

Se sacrificaron las ratas los días 3, 14 y 35 poslesión mediante perfusión intravascular para fijar sus cerebros, para ello recibieron una dosis subletal intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg), se les practicó toracotomía para exponer el corazón, se introdujo un catéter a través del ventrículo izquierdo hasta alcanzar la aorta ascendente y se seccionó la aurícula derecha para permitir el drenaje de sangre y soluciones, se hicieron pasar durante 3 min 150 ml de una solución lavadora a temperatura corporal (0.9% NaCl, con 10,000 UI de heparina y 0.1% procaína), se extrajo el cerebro completo y fue fijado por inmersión con Carnoy (60% de etanol absoluto, 30% de cloroformo y 10% de ácido acético) a 4 °C durante 72 h. con un cambio diario de fijador. A continuación se procedió a la inclusión en parafina de una rebanada del cerebro que contenía la corteza lesionada, en breve: se deshidrató el tejido en etanol absoluto durante 24 h a 4 °C, se hicieron dos cambios de etanol de 2 h cada uno en agitación constante y a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron 3 cambios en xileno, cada uno de 1 h. Finalmente la rebanada se sumergió en parafina, en esta se hicieron 2 cambios de 2 h y se incluyeron en parafina nueva, se orientó la rebanada y se dejó solidificar la parafina. De los tejidos parafinados, en un microtomo se realizaron cortes coronales de 30  $\mu\text{m}$

de espesor para análisis inmunocitoquímico, y de 4  $\mu\text{m}$  para la tinción con hematoxilina-eosina en cortes consecutivos; (Una serie de 8 cortes de 30  $\mu\text{m}$ , seguida por otra serie de cortes de 4  $\mu\text{m}$  y así alternativamente, hasta abarcar toda la zona de lesión. Para el análisis morfológico celular inmunocitoquímico y neuronal, los tejidos fueron rehidratados como se describe: las laminillas con los cortes se incubaron en xileno a 55 °C en baño María (2 x 10 min.), se hizo un cambio en xileno durante 10 min a temperatura ambiente y se rehidrataron en un tren decreciente de alcoholes; absoluto, 96, 90, 80 y 70%, durante 5 min en cada concentración. Finalmente los tejidos se lavaron en PBS 0.1 M para procesamiento inmunocitoquímico, o en agua destilada para la tinción con H/E.

#### 4.5.2. TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA.

Los cortes rehidratados se sumergieron durante 8 min en hematoxilina de Harris (Golden-Bell 63600), se enjuagaron en agua corriente, se decoloraron en alcohol-ácido y se enjuagaron nuevamente en agua corriente, se pasaron por agua amoniacal para cambiar su tonalidad y se enjuagaron en agua corriente, se sumergieron en alcohol al 96% durante 2 min, y se pasaron durante 1 min a una solución de eosina, (es una solución de eosina al 5%, diluida en etanol al 85% a la que se le añade además 0.5% de ácido acético), seguida por 3 lavados de 2 a 3 min en alcohol absoluto y 5 min en xileno. Los tejidos teñidos fueron montados en resina (Entellan de Merck 1 07961 0100) para su análisis microscópico.



El análisis de la población neuronal se realizó sin conocer la identidad de las laminillas, del cerebro de cada rata perteneciente a los diferentes grupos se cuantificó a 400 aumentos el no. de neuronas presentes alrededor de los bordes de la herida, en 150 campos microscópicos de  $739 \mu\text{m}^2$  de tejido. De los valores obtenidos se calculó un índice de neurodegeneración, es decir; el cociente del valor correspondiente al promedio de neuronas con signos degenerativos/ campo, dividido por el número total de neuronas/campo x 100. Para ello se empleó la siguiente fórmula:

Índice de neurodegeneración:

$$\frac{\text{No. de neuronas con signos neurodegenerativos/campo}}{\text{No. total de neuronas /campo}} \times 100$$

#### 4.5.4. TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS E HISTOQUÍMICAS.

**Desenmascaramiento de los tejidos.** Antes de iniciar las técnicas inmunocitoquímicas los tejidos se sometieron a un tratamiento desenmascarante electroquímico, se utilizó una cámara de plástico de 18 cm de largo por 15 cm de ancho y 13 cm de altura, en su interior contenía dos electrodos contra-laterales de carbón mineral, conectados a un cable conductor de corriente eléctrica de 110v, en el interior de la cámara se vaciaron 500 ml de solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) 0.1 M, pH 7.3, los tejidos montados en laminillas se sumergieron en canastillas de vidrio y fueron sometidos a un flujo de corriente eléctrica alterna durante 15 min, sin rebasar los  $60^{\circ}$  C en la solución. Una vez completado el tiempo se hizo el recambio de PBS y se repitió el proceso.

**Inmunocitoquímica para identificación de astrocitos GFAP-positivos y neovascularización mediante marcaje de laminina.** Para identificar astrocitos se utilizaron anticuerpos (ac) dirigidos contra proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína estructural componente principal de los filamentos intermedios que forman parte del citoesqueleto astrocario, y que están presentes en las prolongaciones citoplasmáticas. Para identificación de capilares sanguíneos se utilizaron ac dirigidos contra laminina, principal elemento del tejido conectivo laxo presente en la pared de los capilares, componente principal de su lámina basal. Los cortes previamente desenmascarados se lavaron con solución de PBS 0.1M pH 7.3 con 0.1% de albúmina sérica bovina (Sigma A3059) y 0.2 % de tritón X-100 (Sigma T6878), (tampón de inmuno) dos veces durante 15 min (2x15). Esta misma solución se utilizó para disolver los anticuerpos (ac) y para los lavados intermedios. Las peroxidasa endógenas (mieloperoxidasa presente en los eritrocitos y algunos macrófagos), fueron inactivadas mediante inmersión de los tejidos durante 20 min, en una solución amortiguada compuesta por 10% de metanol y 0.3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para bloquear la inmunorreactividad inespecífica tisular, las preparaciones se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, en una solución compuesta por los aminoácidos glicina 0.2 M y DL-lisina 0.2 M, disueltos en el mismo tampón, y se hicieron lavados (2x15 min). Los tejidos se incubaron con el ac primario durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C, para inmunomarcaje de astrocitos se utilizaron IgG generadas en conejo contra GFAP de médula espinal bovina (Inmunógeno) en dilución 1:800 (Dako Z334), para laminina se utilizaron IgG generadas en ratón contra laminina humana (Dako M0638) en dilución 1:100, una vez completada la incubación se hicieron lavados (2x15 min) y se

incubaron los cortes durante 2 h. con el ac secundario biotinilizado; para GFAP se utilizaron IgG generadas en cabra contra IgG de conejo (Vector BA1000) en dilución 1:250, para laminina se utilizaron IgG generadas en caballo contra IgG de ratón, en la misma dilución (Vector BA2001). La incubación con este ac secundario (de enlace) se realizó durante 2 h a temperatura ambiente y en la oscuridad, una vez concluida se hicieron dos lavados con PBS sin albúmina y Tritón, a continuación siguió la incubación con el compuesto cromógeno ABC Estándar (Vector PK4000) durante 2 h a temperatura ambiente y en la oscuridad, una vez completada se hicieron dos lavados en tampón de inmuno (2x10 min). Los tejidos se revelaron en una solución al 0.03% de 3'3'-diaminobencidina (DAB) (Sigma D7679) con 0.1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma H0904), durante 10-15 min, hasta que se observó una coloración marrón.

**Histoquímica para identificación de microglia.** La microglia se visualizó mediante marcaje con isolectina-B<sub>4</sub> (*Griffonia simplicifolia*) biotinilizada, esta reacción se basa en la gran afinidad química que existe entre la isolectina-B<sub>4</sub> de origen vegetal y los residuos  $\alpha$ -D-galactósidos, presentes en la membrana de éstas células. Los cortes desenmascarados se lavaron previamente con el tampón de inmuno. Se desactivaron peroxidasas endógenas mediante incubación en una mezcla de 10% de metanol y 0.3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, disueltos en PBS 0.1 M, pH 7.3 durante 20 min, se hicieron lavados (2x15 min) y los cortes se incubaron durante 10 min en una solución catiónica compuesta por CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.1 mM, MnCl<sub>2</sub> 0.1 mM, disueltos en PBS 0.1 M para incrementar la afinidad química, se hicieron lavados (2x15 min); los tejidos se incubaron en cámara húmeda con isolectina con peroxidasa acoplada en dilución 1:100 (10.10<sup>-2</sup> mg/ml) disuelta en PBS 0.1M, durante 16 a 20 h a 4°C y en la oscuridad, se

hicieron lavados (2x15 min) y se reveló la reacción durante 10-12 min con una solución de 0.1% de sulfato amónico de níquel disuelto en tampón Tris de HCl pH 8.5 y la misma mezcla de DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> , (hasta que se obtuvo coloración púrpura). Los cortes provenientes de ambas reacciones se deshidrataron a través de cambios en series crecientes de alcohol seguidas de xileno, y fueron montados en portaobjetos con resina (Entellan de Merck).

#### **4.6. PROCEDIMIENTO MORFOLÓGICO CUANTITATIVO.**

De cada rata perteneciente a los diferentes grupos, alrededor de los bordes de la herida (30-3,000  $\mu\text{m}$ ) se cuantificó el número de astrocitos inmunorreactivos a GFAP, y de células de microglia reactivas a isolectina-B<sub>4</sub> presentes en 125 campos microscópicos de 739  $\mu\text{m}^2$ , en el hemisferio lesionado derecho.

La transformación citoplasmática de ambas estirpes celulares se registró a través del método modificado de Weibel, consistente en el conteo del número de intersecciones de las ramificaciones citoplásmicas de los astrocitos y las células de microglia, con los círculos concéntricos de una rejilla estereológica. La rejilla consistió de 5 círculos concéntricos, con una separación entre ellos de 90  $\mu\text{m}$ , en una amplificación de 400X. Para el análisis de laminina se siguió un procedimiento diferente, se detectó su inmunoreactividad en una amplificación de 100X mediante registro arbitrario de píxeles en un software analizador de imágenes (Leica QWIN500) conectado al microscopio mediante una videocámara, de la zona de lesión en cada corte se

registró la cantidad total de la marca presente, el programa realizó los cálculos necesarios para expresar dicha medición en  $\mu\text{m}^2$ .

#### 4.6.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS:

Se utilizó la prueba estadística de ANOVA de una sola vía para comparar el grupo control con los experimentales, la comparación *post hoc* de valores de medias se realizó utilizando la prueba de Bonferroni, con un nivel de confianza de  $p < 0.05$  para definir como significativas las diferencias.

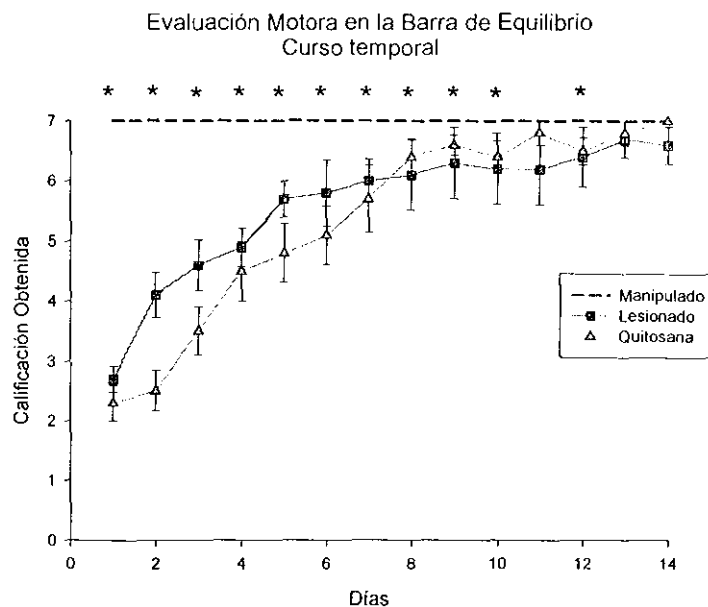
## V. RESULTADOS

Durante el procedimiento quirúrgico de lesión cortical por aspiración no se presentaron complicaciones asociadas al procedimiento quirúrgico. Los animales presentaron hemiplejía izquierda como resultado de la lesión, manifestada por limitación deambulatoria ipsilateral. La tasa de mortalidad del procedimiento quirúrgico fue cero ya que todos los animales sobrevivieron a la lesión. El volumen total de tejido cerebral extraído fue equivalente a  $\approx 48 \text{ mm}^3$ .

Por otra parte, la aplicación focal de la quitosana en el cerebro no pareció afectar la recuperación de la herida, ya que no se observaron signos macroscópicos patognomónicos de proceso inflamatorio agudo: eritema, edema, rubor y calor; así como tampoco procesos infecciosos. Asimismo, la quitosana se observó casi integra a los 3 días, a los 14 días el tamaño del implante se observó de menor tamaño, esto sugiere que el tejido degradó parcialmente la quitosana, ya que a los 35 días el implante fue aún más pequeño. Por otro lado, al momento del sacrificio y obtención del tejido cerebral en cualquier etapa, el implante se separó fácilmente del tejido. En la valoración microscópica se observó una banda de células inflamatorias alrededor de la cavidad que alojaba el implante. Durante estas etapas de análisis macroscópico del aspecto superficial del cerebro lesionado y con implante de quitosana, destacó el hecho de que en los tejidos implantados con el hidrogel se apreciaron muchos menores rastros de sangre, la quitosana ejerció un efecto hemostático importante, tal como ha sido ampliamente documentado en otros estudios previos (Brandenberg, 1984).

## **5.1. EVALUACIÓN MOTORA**

Durante la fase de entrenamiento (previo a la cirugía) todos los animales aprendieron rápidamente a atravesar la barra de equilibrio con una calificación máxima de 7 (ejecución normal). Sin embargo, en la evaluación del desempeño (posquirúrgico) de los 10 animales de cada grupo, los registros obtenidos mostraron diferencias. La gráfica 1, muestra el curso temporal de la ejecución motora durante los 14 días de la fase de evaluación, el grupo manipulado mantuvo la calificación de 7 durante los 14 días de prueba, con esto se descarta la presencia de algún posible fenómeno de extinción y se sustenta la confiabilidad de esta prueba durante período prolongados de evaluación. En contraste, los dos grupos lesionados (con o sin quitosana) manifestaron una ejecución semejante el 1er día de esta prueba ( $2.7 \pm 0.21$  y  $2.3 \pm 0.30$ , respectivamente;  $p < 0.05$ ), esto sugiere que la lesión produjo déficit semejante, a pesar de la presencia intraparenquimal de la quitosana. El mismo fenómeno se observó a través de la prueba, y en ninguno de los días resultaron diferencias significativas entre estos dos grupos. Por otra parte, a medida que transcurrieron los ensayos de los dos grupos; animales lesionados y lesionado+quitosana, mostraron una mejoría gradual, hasta lograr la recuperación motora por completo a los 13 días de evaluación motriz.



**Gráfica 1. Resultados de la ejecución motora en la barra de equilibrio, de las ratas controles y lesionadas.** Calificación obtenida durante los 14 días posesión. (\*) Indica diferencias significativas entre el grupo manipulado y los grupos; lesionado y lesionado + quitosana. Los valores corresponden a la media  $\pm$  el Error Estandar (ES),  $p < 0.05$ , t-student.

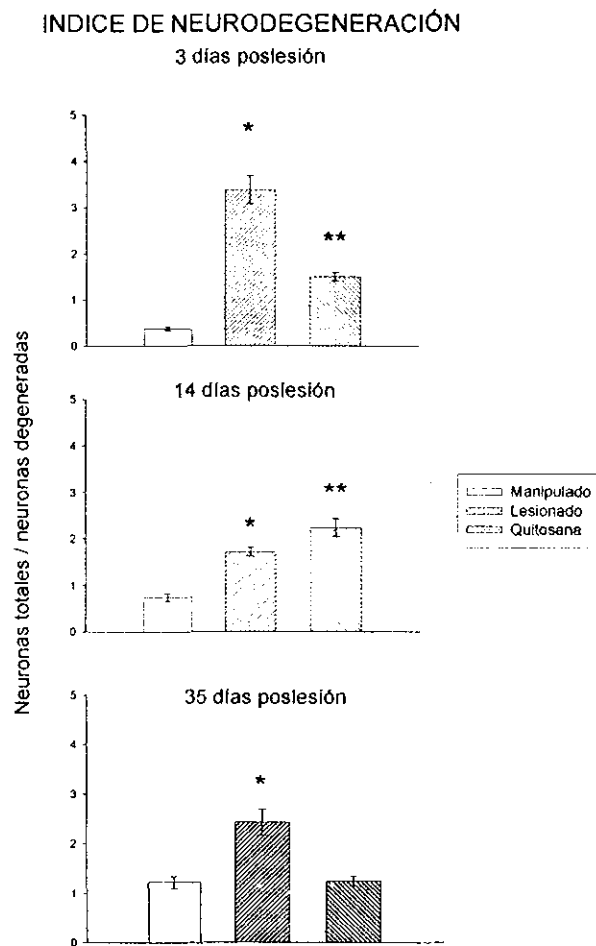
## 5.2 ANÁLISIS MORFOLÓGICO.

### 5.2.1. ÍNDICE DE NEURODEGENERACIÓN

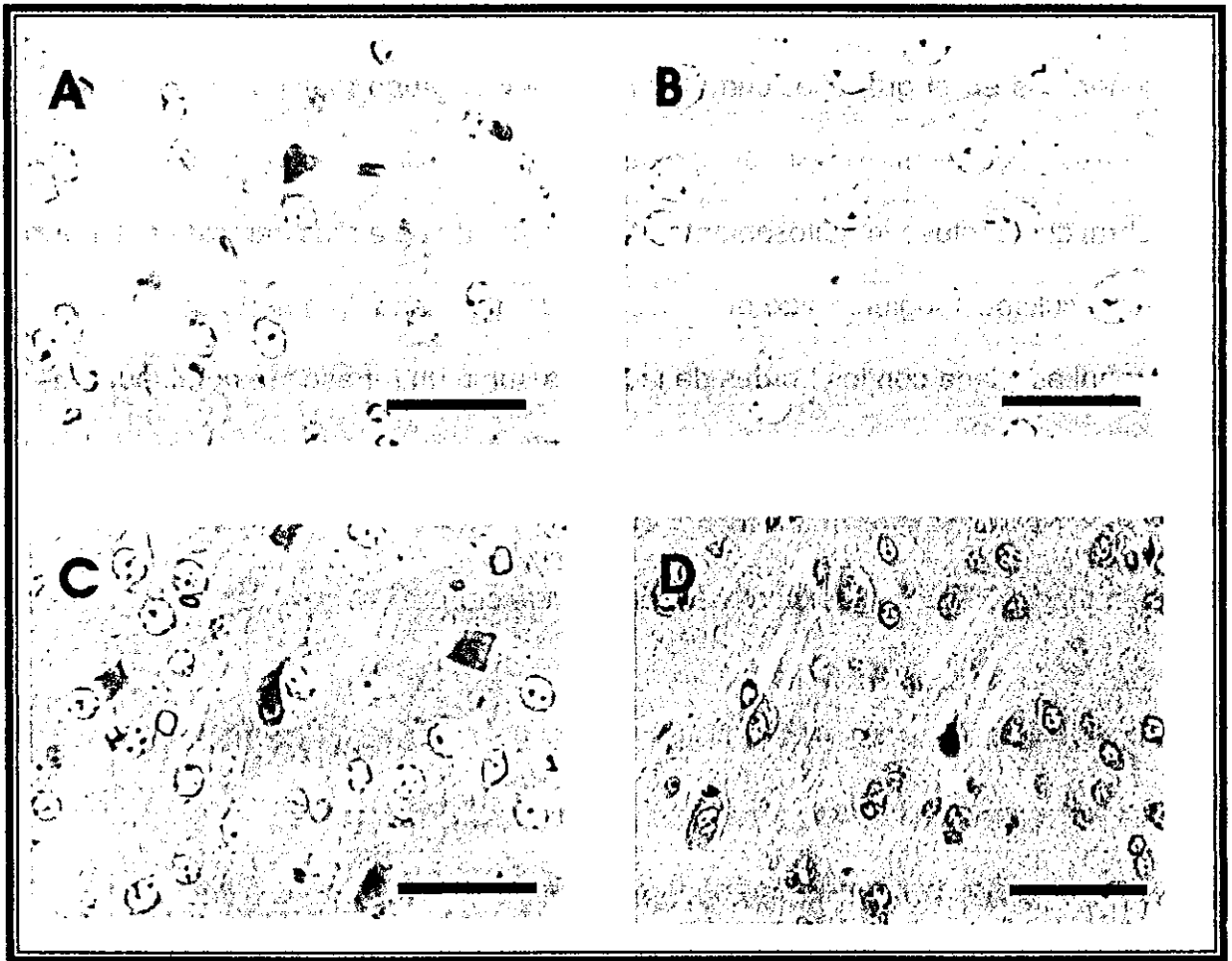
**Cuantificación neuronal.** A los tres días resultó un mayor número de neuronas degeneradas por campo en el grupo lesionado ( $3.11 \pm 0.275$ ,  $P < 0.05$ ) en comparación al de lesionado+quitosana y este último fue significativamente mayor que el grupo control manipulado ( $1.50 \pm 0.092$  y  $0.37 \pm 0.045$ , respectivamente  $P < 0.05$ ) (**Gráfica 2.**) En contraparte, ocurrió lo contrario a los 14 días encontrando un índice de neurodegeneración mayor en el grupo lesionado+quitosana con respecto al lesionado; ( $2.26 \pm 0.171$  y  $1.72 \pm 0.097$ , respectivamente  $P < 0.05$ ) aunque este último mostró un mayor índice que el grupo manipulado ( $0.74 \pm 0.076$ ,  $P < 0.05$ ). A los 35 días el análisis reveló que el grupo lesionado ( $2.44 \pm 0.026$ ,  $P < 0.05$ ) mostró un mayor número



de neuronas degeneradas por campo, a diferencia del número de neuronas degeneradas en el grupo lesionado+quitosana y el grupo manipulado ( $1.24 \pm 0.096$  y  $1.24 \pm 0.092$ , respectivamente  $P < 0.05$ ) los cuales fueron similares, sugiriendo que el tejido cerebral que contuvo la quitosana manifestó una morfología más parecida a la normal. Estos resultados sugieren que en presencia de quitosana, la muerte de la población neuronal asociada con los bordes de la herida sufrió un retraso temporal, además de un índice de neurodegeneración disminuido (Fig. 5).



**Gráfica 2.** Índice de neurodegeneración a los 3 y 14 días posesión, (\*) indican diferencias con respecto al manipulado, (\*\*) indica diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores de animales de operación simulada y solo lesionados, las barras muestran la media  $\pm$  ES. ANOVA- Bonferroni ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 8. Neurodegeneración.** Cortes coronales de la corteza cerebral de ratas teñidos con H/E una amplificación de 100X, se muestra el curso temporal de los tejidos lesionados + quitosana comparados con tejidos control-manipulado; a) 3 días poslesión, b) manipulado, c) 14 días poslesión, d) 35 días poslesión.

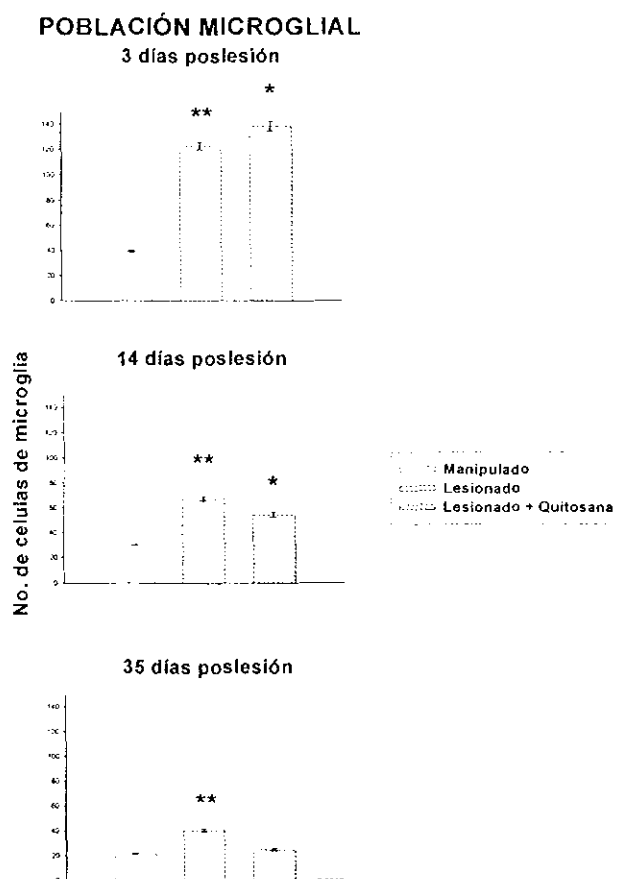
### 8.2.2. HISTOQUÍMICA DE MICROGLIA.

**a) Cuantificación poblacional.** El número de células de microglia se registró hasta a una distancia aproximada de 1500  $\mu\text{m}$ , a partir de los bordes de la herida debido al escaso marcaje de esta estirpe celular en las zonas aledañas al sitio de lesión en los tejidos de los animales sacrificados a los 14 y 35 días poslesión, lo cual contrasta con lo observado a los 3 días poslesión, en esta etapa la marca con isolectina B<sub>4</sub> fue

muy clara. A los 3 días poslesión se observó un notable incremento del número de células en los tejidos de ambos grupos; lesionados y lesionado+quitosana ( $138.39 \pm 4.98$  y  $123.08 \pm 3.79$  respectivamente;  $p < 0.05$ ), con respecto a las ratas del grupo manipulado, ( $39.30 \pm 0.98$ ),  $p < 0.05$ , grafica 3. De esta forma se manifestó el impacto de la lesión producida por la aspiración del tejido cerebral, este incremento fue mayor en el grupo lesionado+quitosana. Por otro lado, a los 14 y 35 días se registró una disminución de dicha población en ambos grupos lesionados; sin embargo, el número de células fue significativamente mayor en los tejidos del grupo lesionado ( $67.69 \pm 2.30$ , 14 días y  $40.64 \pm 1.60$ , 35 días;  $p < 0.05$ ) con respecto a la comparación entre el grupo lesionado+quitosana y controles manipulados, ( $29.99 \pm 0.67$  y  $54.27 \pm 2.43$ ;  $p < 0.05$ , 14 días), la cuantificación poblacional en estos dos grupos fue similar en la última etapa poslesión analizada, ( $24.83 \pm 1.40$  y  $21.65 \pm 0.67$ ;  $p < 0.05$ , 35 días) sugiriendo que la población microglial alcanzó valores normales (**Fig. 6**).

**b) Transformación de microglia.** La transformación más notable de estas células se produjo en la zona más cercana al borde de la herida, se cuantificó el número de intersecciones citoplasmáticas de por lo menos 5 células en el campo microscópico más próximo a la zona de lesión. Al tercer día poslesión se observaron diferencias de la morfología celular entre los tres grupos, en la grafica 4 el grupo lesionado+quitosana presentó el menor número de intersecciones ( $4.89 \pm 0.49$ ;  $p < 0.05$ ) debido a que las células habían iniciado su transformación y empezaron a adquirir una forma ameboidea-fagocítica, el grupo lesionado ( $7.35 \pm 0.45$ ;  $p < 0.05$ ) mostró una ligera desramificación del citoplasma microglial, mientras que las células de microglia en “reposo” aparecieron ramificadas en los tejidos de las ratas controles manipuladas

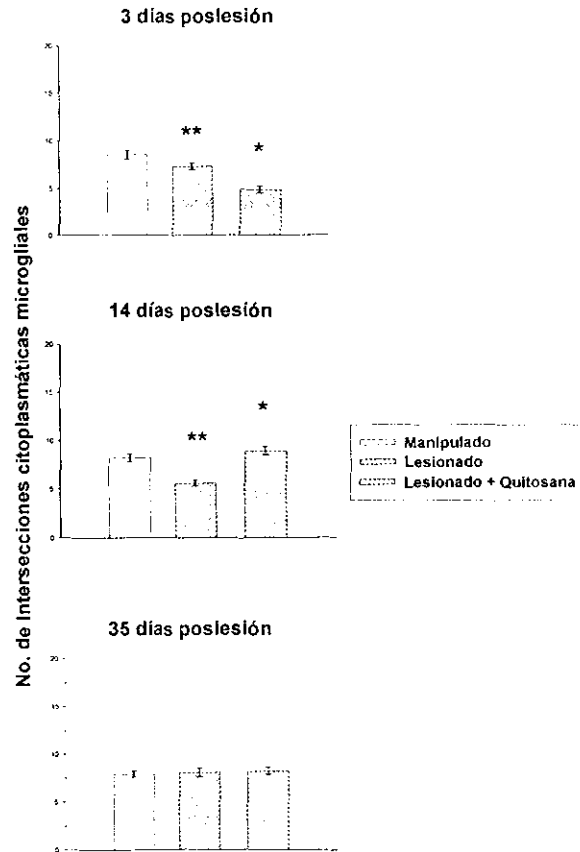
( $8.56 \pm 0.59$ ;  $p < 0.05$ ). Sin embargo, a los 14 días poslesión sucedió lo contrario, el número de intersecciones en las células de microglia se incrementó en el grupo lesionado+quitosana, cuyos valores fueron similares a los de las ratas controles ( $8.93 \pm 0.56$  y  $8.19 \pm 0.53$ , respectivamente;  $p < 0.05$ ), esto es indicativo de que las células de microglia estaban volviendo a su condición de ramificación normal. Por su parte, las células del grupo lesionado continuaron reactivas, con tendencia a adoptar formas ameboides ( $5.58 \pm 0.37$ ;  $p < 0.05$ ). A los 35 días no se observaron diferencias entre los tres grupos, en lo tejidos de las ratas lesionadas se normalizó la citoarquitectura microglial, independientemente de la presencia de quitosana, (L+Q  $8.08 \pm 0.58$ , L  $8.22 \pm 0.51$  y M  $7.89 \pm 0.42$ ;  $p > 0.05$ ) (Fig. 6).



Gráfica 3. Cuantificación del número de células de microglia. A los 3, 14 y 35 días poslesión. (\*) indica diferencias estadísticamente significativas de las ratas lesionadas + quitosana, con el grupo control manipulado,

(\*\*) indican diferencias entre los grupos, manipulado y lesionado. Las barras muestran la media  $\pm$  E.S. ANOVA-Bonferroni ( $P < 0.05$ ).

**TRANSFORMACIÓN MICROGLIAL**

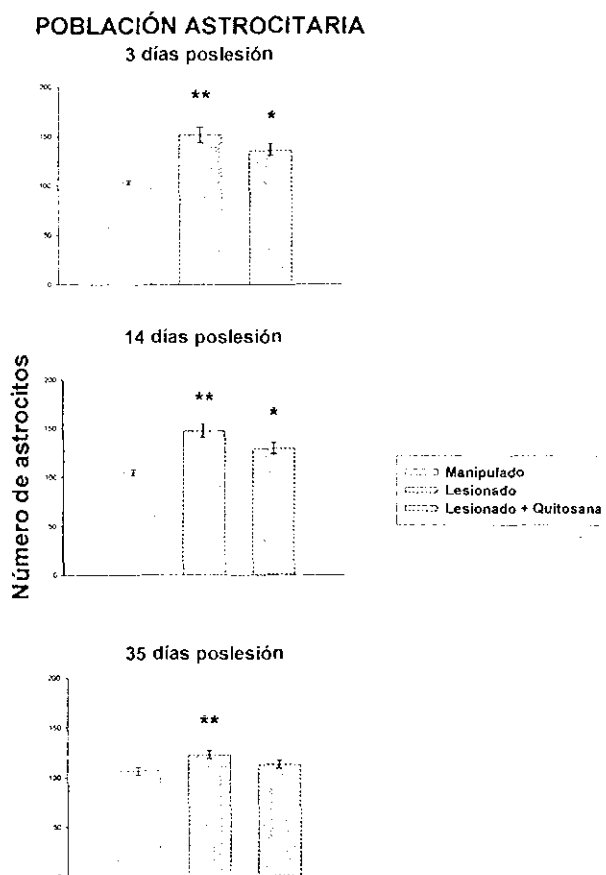


Gráfica 4. Cuantificación del número de intersecciones de células de microglia. A los 3, 14 y 35 días posesión, (\*) indica diferencias con respecto al grupo e ratas controles manipuladas, (\*\*) indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de animales manipulados y lesionados, las barras muestran la media  $\pm$  E.S. ANOVA- Bonferroni ( $P < 0.05$ ).

**5.2.3. INMUNOCITOQUÍMICA DE ASTROCITOS**

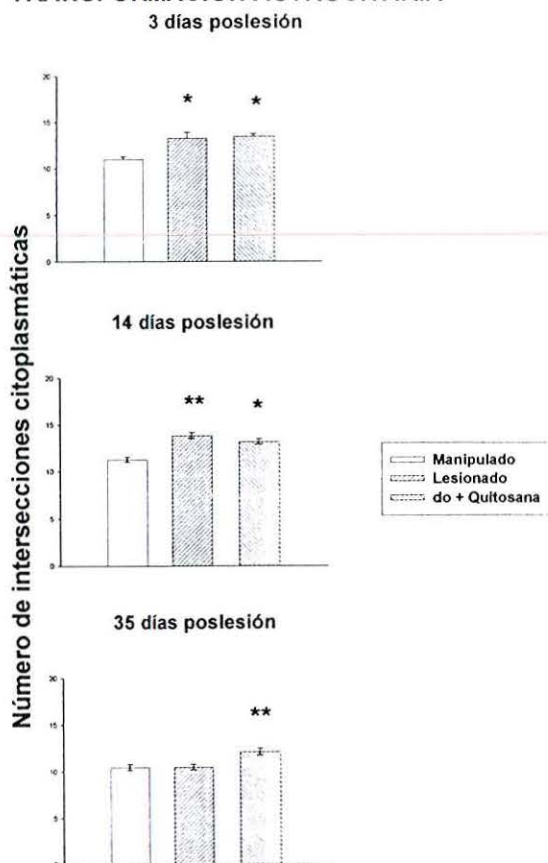
**a) Cuantificación poblacional.** Se registró el número de astrocitos presentes en los bordes de la herida, aproximadamente hasta la misma extensión que las células de microglia. En la gráfica 5 se observa que la población de astrocitos registrados en los bordes de la herida de las ratas lesionadas ( $177.50 \pm 3.00$ , 3 días y  $140.92 \pm 4.13$ , 14 días;  $p < 0.05$ ) fue significativamente mayor que los valores obtenidos de tejidos de ratas

lesionadas+quitosana y controles manipuladas, a todo lo largo del curso temporal analizado (3 días  $154.58 \pm 5.00$  y  $106.47 \pm 1.06$ , 14 días  $123.92 \pm 2.38$  y  $101.93 \pm 1.05$ , respectivamente,  $p < 0.05$ ). Aun cuando se observó un incremento del número de astrocitos en los cortes de los animales lesionados, y que recibieron el implante intracerebral de quitosana, los valores fueron semejantes a los de las ratas controles, especialmente en la última etapa analizada (M  $111.45 \pm 2.57$  L  $123.02 \pm 1.96$  y L+Q  $117.90 \pm 2.64$ ,  $p < 0.05$ ). Esto sugiere que la quitosana redujo las consecuencias de la lesión a través del tiempo (Fig. 6).



**Gráfica 5. Población astrocitaria a los 3, 14 y 35 días posesión.** (\*) indican diferencias con las ratas controles manipulados, (\*\*) indica diferencias estadísticamente significativas entre ratas lesionadas (sin quitosana) y controles. Las barras muestran la media  $\pm$  ES. ANOVA- Bonferroni ( $p < 0.05$ ).

### TRANSFORMACIÓN ASTROCITARIA

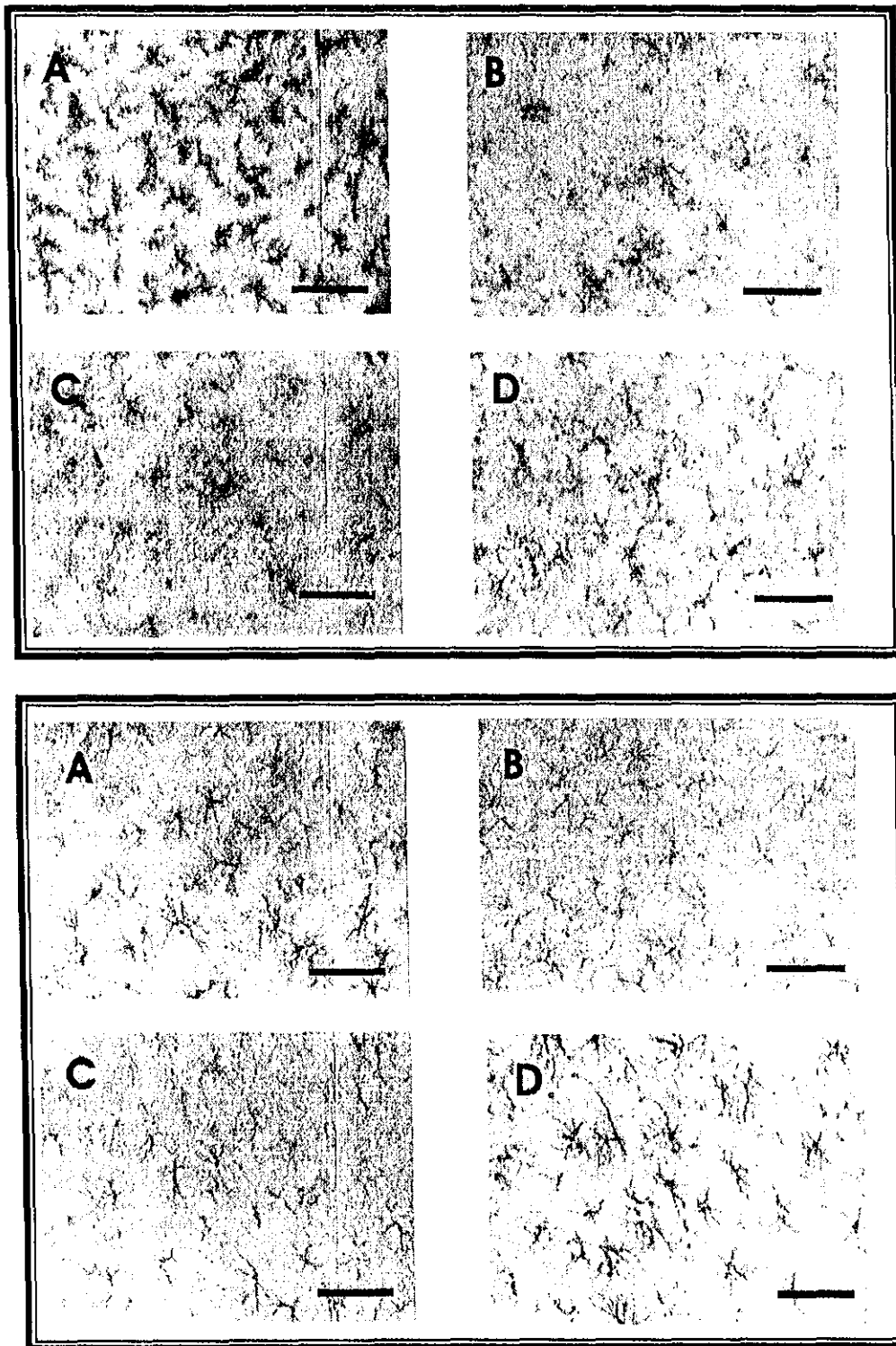


Gráfica 6. Cuantificación del número de intersecciones del citoplasma astrocitario, con los círculos concéntricos de la red de prueba. A los 3, 14 y 35 días posesión, (\*) indican diferencias en comparación con los tejidos de las ratas controles manipuladas, (\*\*) indican diferencias entre animales controles y lesionados, las barras muestran la media  $\pm$  ES. ANOVA- Bonferroni ( $p < 0.05$ ).

**b) Transformación astrocitaria.** La cuantificación del grado de transformación en los astrocitos se realizó de la misma manera que para las células de microglia. La grafica 6 muestra que los grupos lesionado ( $13.313 \pm 0.334$ ;  $p > 0.05$ ) y lesionado+quitosana ( $13.501 \pm 0.135$ ;  $p > 0.05$ ), presentaron un incremento similar en el número de intersecciones a los 3 y 14 días posesión, por lo que en estas dos etapas, ambos difirieron significativamente de los animales controles manipulados ( $10.98 \pm 0.164$ ;  $p > 0.05$ ). Sin embargo, a los 14 días el número de intersecciones fue significativamente mayor en las ratas lesionadas, comparadas con el grupo de ratas

lesionadas + quitosana ( $13.84 \pm 0.165$  y  $13.19 \pm 0.14$ , respectivamente;  $p < 0.05$ ), pero ambos presentaron valores mayores que los de las ratas controles manipulados ( $11.28 \pm 0.13$ ;  $p < 0.05$ ). A los 35 días, en los animales lesionados sin quitosana se redujo la astrogliosis hasta niveles semejantes a los de ratas controles manipuladas, que no fueron lesionadas (M  $10.463 \pm 0.171$  y L  $10.463 \pm 0.149$ ;  $p > 0.05$ ), mientras que en lo tejidos de ratas lesionadas + quitosana persistió la astrogliosis ( $12.117 \pm 0.181$ ;  $p < 0.05$ ) (**Fig. 6**).

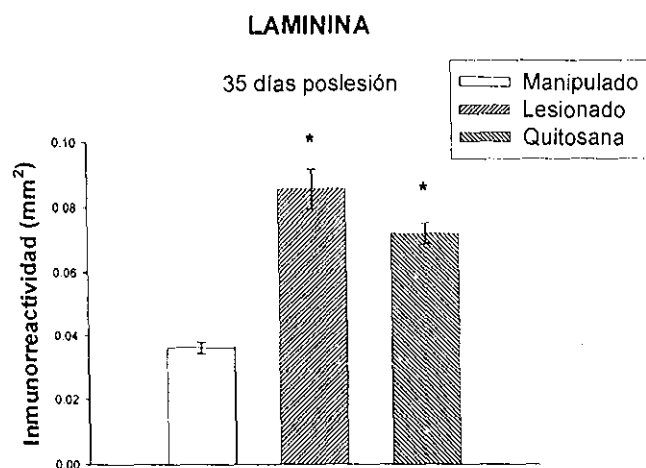




**Fig. 6. Reactividad Glial.** Cortes coronales de la corteza cerebral de ratas a una amplificación de 100X, que muestran el curso temporal de tejidos lesionados + quitosana comparados con tejido control-manipulado; a) 3 días poslesión, b) tejido manipulado, c) 14 días poslesión, d) 35 días poslesión. La sección superior muestra tejidos marcados con isolectina B4, la sección inferior tejidos inmunomarcados para GFAP.

#### 5.2.4. INMUNOCITOQUÍMICA PARA LAMININA.

**Inmunorreactividad a laminina.** La cuantificación de laminina solo se realizó a los 35 días poslesión, mediante medición del marcaje en  $\text{mm}^2$  de cada rebanada, en la zona inmediata al borde de lesión. En la gráfica 7 se muestra la marca de tejidos normales (ratas controles manipuladas), así como el incremento resultante en los tejidos lesionados ( $0.086 \pm 0.006 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0.05$ ), indicativo de revascularización. En los tejidos de ratas lesionadas con quitosana intracerebral ( $0.072 \pm 0.003 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0.05$ ), la marca fue menor en los cortes, pero significativamente mayor que los valores basales registrados en las ratas controles manipulados ( $0.036 \pm 0.001 \text{ mm}^2$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig. 7).



Gráfica 7. Inmunmarcaje para laminina ( $\text{mm}^2$ ). A los 35 días poslesión (\*), indican diferencias entre los animales lesionados, con respecto a las ratas controles manipuladas, las barras muestran la media  $\pm$  ES ANOVA- Bonferroni, ( $p < 0.05$ ).

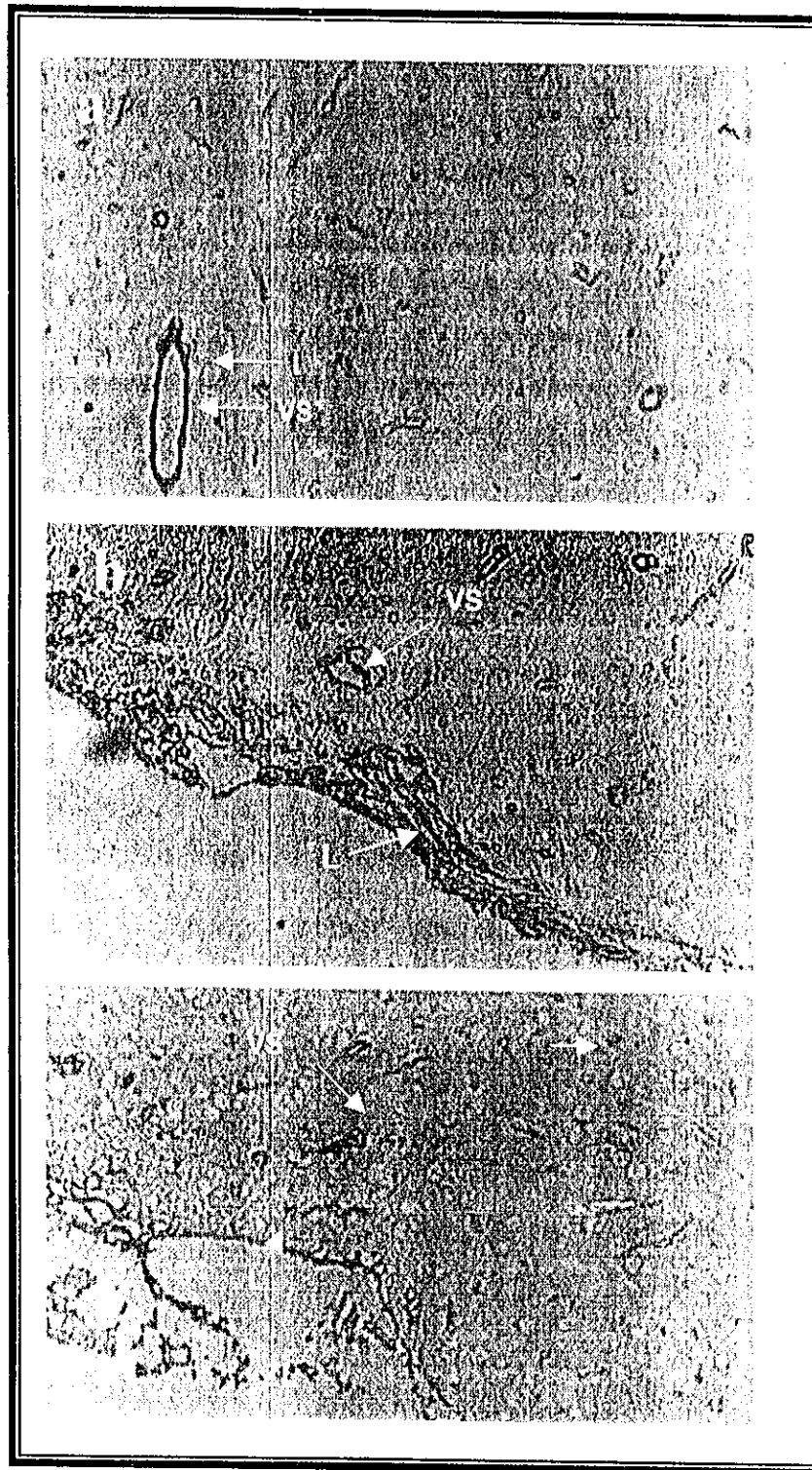


Fig. 7. Reactividad a laminina. Cortes coronales de la corteza cerebral de ratas inmunomarcados con laminina a una amplificación de 10X, se muestra la zona de lesión. a) manipulado, b) lesionado, c) quitosana, VS vaso sanguíneo, L inmunoreactividad a laminina, ZL zona de lesión.

## VI. DISCUSION

En nuestro estudio se evaluaron los efectos del implante intracerebral de quitosana en hidrogel, sobre la respuesta de la corteza cerebral lesionada de ratas adultas, hasta la fecha no existen reportes previos sobre la utilización de gel de quitosana a nivel del parénquima cerebral, solo se documenta su aplicación en el nervio periférico axotomizado de ratas y nervio facial de conejos, con buenos resultados (Gómez-Pinedo et al, 2001). Por otro lado, este biomaterial ha sido utilizado para muchas otras aplicaciones biomédicas en seres humanos, especialmente para reparar tejidos superficiales (Muzzarelli, 1977), como vehículo para la liberación prolongada de otras sustancias, mediante la formación de micro-esferas, como relleno para lesiones por aplastamiento donde resulta pérdida de tejido y posterior necrosis, y como agente hemostático, entre otras (Jameela et al, 1998; Brandenberg et al, 1984). Sin embargo, no se había contemplado la aplicación explorada en este trabajo.

### **6.1. EVALUACIÓN MOTORA**

Durante el periodo de evaluación de la prueba de equilibrio en la barra las ratas no lesionadas alcanzaron la plataforma de escape, obteniendo la máxima calificación de 7, con lo cual se descarta que haya sucedido algún fenómeno de extinción por la repetición del mismo estímulo y se confirma la validez de esta prueba. En contraparte, todos los animales lesionados manifestaron déficit motor evidente al inicio de la prueba; al final de la evaluación todos ellos se habían recuperado completamente, sin que hubiera diferencias atribuibles a la presencia intracerebral de

quitosana, lo cual sugiere que ella no tuvo ningún efecto sobre el desempeño de esta tarea.

Al parecer esta prueba no reflejó los efectos esperados, por el relleno de la lesión cerebral con quitosana, sobre la recuperación motora posterior. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, que tampoco encontraron efectos favorables evidentes sobre la recuperación funcional motriz, en animales que recibieron implante con otros biomateriales, aún cuando a nivel morfológico si resultaron efectos favorables (Woerly et al, 1999).

## 6. 2. VALORACIÓN MORFOLÓGICA

### 6.2.1. NEURODEGENERACIÓN, REACTIVIDAD GLIAL Y NEOVASCULARIZACIÓN.

**Neuronas:** Durante una lesión focal se produce la muerte inmediata de muchos tipos celulares, entre ellos las neuronas debido principalmente a procesos necróticos, también tiene influencia el reclutamiento de células inflamatorias y de microglia en la zona lesionada, dentro de las primeras 72 h poslesión (García et al, 1995; Stoll & Jander, 1999), la muerte de aquellas neuronas asociadas al daño primario por efecto de la lesión se completa a las pocas horas, aquellas neuronas que no murieron por el impacto de la lesión mueren por la citotoxicidad generada en el micro-ambiente, o bien al desencadenarse la activación de genes proapoptóticos. Normalmente en lesiones de este tipo, la muerte de neuronas cesaría aproximadamente en 3-7 días

(Burns, 1998; Fawcett & Ascher, 1999; Stichel & Müller, 1998). En los datos presentados en este trabajo observamos que el grupo lesionado sin implante de quitosana se comporta de manera similar a lo anteriormente descrito, dado que presenta una gran cantidad de neuronas muertas; en el grupo con quitosana implantada, sucedió lo opuesto ya que mostró una menor cantidad de neuronas muertas por campo a los 3 días poslesión.

Por otro lado, contrario a lo previsto en este trabajo, la cantidad de neuronas muertas por campo se incrementó significativamente a los 14 días en los animales que fueron implantados de quitosana en la lesión, esta población de neuronas necróticas sobrepasó los valores observados a los 3 días en este mismo grupo, ello podría sugerir que la quitosana indujo la muerte neuronal retardada, sin que podamos explicar la razón de esto, ya que posteriormente a los 35 días poslesión los valores fueron comparables a los de los tejidos de ratas lesionadas con quitosana de 3 días poslesión, mientras que los tejidos de las ratas lesionadas y sin relleno de quitosana mostraron una mayor cantidad de neuronas con signos degenerativos, como ha sido normalmente descrito en este tipo de lesiones (García et al, 1995).

Probablemente la quitosana ejerció efectos neuroprotectores en los primeros estadios (3 días poslesión), que temporalmente permitieron una mayor supervivencia neuronal. Este hallazgo indica que la presencia intracerebral de quitosana no aumentó la severidad del daño, ya que los mayores valores observados al día 14, fueron comparables a los del grupo de animales lesionados y sin relleno de quitosana, registrados en el día 35. En síntesis, podemos afirmar que la presencia de

quitosana intracerebral provocó un desfasamiento temporal de la muerte neuronal asociada con la herida y facilitó la resolución del daño, por lo que si ejerció efectos favorables en el cerebro lesionado.

**Microglia.** Del análisis de la población de microglia marcada con isolectina-B<sub>4</sub>, es importante tener en cuenta que esta técnica está basada en un fenómeno de afinidad química simple, de las isolectinas provenientes de la planta *Griffonia simplicifolia*, con los residuos de azúcares presentes en la cubierta celular de estas células y del endotelio vascular, por lo que el criterio numérico tiene un valor relativo, al no haber utilizado un marcador de proliferación como la BrdU (exógeno) o anticuerpos dirigidos contra una proteína no histona que se expresa durante el ciclo celular (Proliferation Cell Nuclear Antigen), por lo tanto lo que aquí se muestra corresponde principalmente a transformaciones metabólicas, posiblemente asociadas con proliferación microglial, que parece escasa, al haberse reducido la población a través del curso temporal estudiado.

En el primer estadio analizado (tres días poslesión) se observó una mayor cantidad de células tanto en las ratas lesionadas sin relleno de quitosana, como en los tejidos de las lesionadas + quitosana, aunque la cantidad fue ligeramente mayor en presencia de quitosana, a los 14 días se observó una notable disminución del número de células de microglia en ambos grupos, siendo más cercana a la normalidad las muestras de tejido cerebral con relleno de quitosana y esta misma tendencia continuó hasta los 35 días poslesión, en esta etapa solamente las preparaciones de animales lesionados que no recibieron quitosana conservaron

valores superiores a los normales (Gráfica 3), lo anterior indica que la quitosana contribuyó a normalizar la respuesta inflamatoria del tejido dañado, sin desencadenar respuesta a cuerpo extraño.

El pico máximo de reactividad de la microglia se produce a los tres días, en que sucede migración y proliferación de estas células, junto con disminución de sus prolongaciones, esta respuesta intensa generalmente está asociada con el reclutamiento de macrófagos (Jensen et al, 1994; Stoll & Jander, 1999; Streit et al, 1997), la evolución de éste fenómeno está de acuerdo con los resultados obtenidos en cortes de tejidos de ratas lesionadas por aspiración, observamos una población numerosa con diferentes morfologías, indicativas de que sucedió transformación de su citoplasma; sin embargo, en los cerebros de ratas lesionadas y que recibieron quitosana intraparenquimal, se observó una mayor reactividad microglial, asociada con la respuesta inflamatoria, reflejada por disminución de sus prolongaciones citoplasmáticas, ya que empezaban a desramificarse (tercer día poslesión). La quitosana ha mostrado una gran capacidad de atracción hacia los macrófagos (Peluso et al, 1994); por otro lado, estos comparten ciertas características con las células de microglia (Cotton & Gilbert, 1987), probablemente la reactividad microglial observada a los tres días poslesión se debió a que la quitosana ejerció un efecto de atracción, tanto de microglia como de macrófagos. Cuando el agente responsable de provocar la inflamación persiste por largo tiempo, la reacción microglial se torna crónica (Stichel & Müller, 1998; Stoll et al, 1998; Streit et al, 1997), no obstante que a los 14 y 35 días poslesión todavía persistió el implante de quitosana, esta no actuó como cuerpo extraño, pues a los 14 días poslesión se redujo la población de células microgliales



ameboides y volvieron a mostrarse ramificadas, por lo que su aspecto fue bastante parecido al de la población microglial normal.

**Astroцитos.** Para interpretar la respuesta de estas células, se aplica la misma observación comentada para microglia, solo que a través del curso temporal estudiado: 3, 14 y 35 días poslesión aunque las variaciones numéricas fueron menos evidentes para estas últimas; en todas las etapas se observó una mayor población de astroцитos en los tejidos lesionados que no tuvieron el hidrogel de quitosana, así como una normalización gradual a través del tiempo, de tal forma que los valores persistieron incrementados, al compararlos con los de ratas controles manipulados.

Estas células comienzan a reaccionar poco después de haberse activado la microglia y alcanzan su reactividad máxima entre la primera y segunda semana poslesión, resultando un incremento de su número y ramificaciones, fenómenos conocidos como hiperplasia e hipertrofia. (Fawcett & Ascher, 1999; Hozumi et al, 1990; Jensen et al, 1994; Stichel & Müller, 1998), que pueden persistir por periodos largos de tiempo, hasta de 6 meses.

Los datos referentes al parámetro de población permiten afirmar que la reactividad astroglial fue ligeramente menor en presencia de quitosana, a través del estudio. En cuanto a las ramificaciones astrocitarias, este parámetro no resultó muy aumentado a pesar de la severidad de la lesión y tampoco se apreciaron diferencias importantes atribuibles a la presencia intracerebral de quitosana a los tres días poslesión; en las otras dos etapas examinadas de 14 y 35 días tampoco se produjeron variaciones

importantes, solo que los valores de las ratas lesionadas sin implante de quitosana recuperaron la normalidad al finalizar el estudio y en presencia de quitosana persistió levemente aumentada la transformación citoplasmática.

Al respecto, esta transformación del citoplasma astrocitario pudo haberse debido a una reorganización de los filamentos intermedios estables, frente a una mayor demanda metabólica, para compensar las consecuencias del daño, el principal componente de estos filamentos es la proteína ácida fibrilar glial, contra la cual se dirigieron anticuerpos en este estudio, pese a que este tipo de reacciones son de bastante duración, al día 35 la transformación citoplasmática había permanecido estable en presencia de quitosana, lo que descarta que ésta haya actuado como un irritante, es muy probable que a través del tiempo estas células alcanzarán la normalidad. Esto es importante, debido a que los astrocitos participan directamente en los mecanismos de respuesta tisular frente al daño, así como en los mecanismos de remodelación nerviosa y plasticidad sináptica, que podría permitir el establecimiento de nuevos sitios de contacto sináptico, de prolongaciones neuronales vecinas al sitio de la lesión, como un mecanismo de compensación del déficit, además, las prolongaciones citoplasmáticas, particularmente las terminales, actúan como una barrera física para permitir que se establezcan o se separen nuevas sinapsis sobre la membrana neuronal, (Sato et al, 2001; Weinstein et al, 1991).

**Laminina.** La vascularización inicia después del proceso de cicatrización glial, aproximadamente dentro de las dos primeras semanas siguientes a la lesión. (Sahia et al, 2000; Stichel & Müller, 1998). En este estudio se observó reactividad intensa para

laminina alrededor de los bordes de la herida en los tejidos que no recibieron quitosana, esto no sucedió en aquellos con implante de quitosana. Probablemente la inhibición de los astrocitos redujo parcialmente la síntesis del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que producen éstos, lo cual se relaciona con lo observado en otros estudios en los que se ha reportado que la angiogénesis esta muy relacionada con el VEGF que liberan los astrocitos, a mayor expresión de astrocitos, mayor es la liberación de VEGF y por tanto un incremento en la cantidad de vasos sanguíneos (Salhia et al, 2000).

De todo lo arriba descrito se puede resumir lo siguiente, al lesionar el parénquima cerebral inicialmente se activan las células de microglia (Stoll & Jander, 1999), produciendo citocinas pro-inflamatorias, así como radicales libres que provocan la muerte de las neuronas, asimismo, la microglia actúan enviando señales a los astrocitos mediante la IL-1 para que estos se activen, ellos pueden transformarse incrementando la extensión y complejidad de sus arborizaciones citoplasmáticas (hipertrofia) o bien pueden empezar a dividirse para concentrarse en la zona de lesión (hiperplasia), como resultado de lo anterior se inicia la formación de una cicatriz glial incipiente, que posteriormente madura por la presencia de otros componentes de matriz extracelular como fibrinógeno y colágena tipo IV (Brodkey & Laywell, 1995).

Posteriormente estos mismos astrocitos pueden ser responsables de que se desarrolle una cicatriz glial hipertrófica, que por su alto grado de organización estructural puede actuar como impedimento para la reconexión de las áreas

dañadas, mediante la penetración de prolongaciones neuronales (Yong, 1998), esta situación fue uno de los principales propósitos de este estudio, pretendimos inhibir la astrogliosis reactiva al rellenar con quitosana el hueco resultante por la aspiración de la corteza cerebral de ratas adultas; además de que la quitosana posee un importante efecto hemostático (Brandenberg, et al, 1984).

Por lo tanto, una de las principales aportaciones de este estudio fue demostrar que la quitosana fue bien tolerada, además de que actuó como un medio de comunicación entre los bordes de la herida, con lo que esperamos se evitaría la exclusión de la zona lesionada por la formación de bordes cicatrizales, ésta buena aceptación del biomaterial por el tejido nervioso se infiere debido a que las células de microglia tuvieron una reactividad intensa de corta duración (3 días poslesión), y ésta no persistió de forma crónica, la reactividad inicial de estas células podría estar relacionada a la afinidad que las células de tipo fagocíticas (microgliales) presentan con la quitosana; asimismo, observamos que la respuesta astrocitaria ante la presencia del hidrogel fue positiva, al inhibir la formación de una cicatriz glial hipertrófica, como fue parcialmente observado en este estudio, esto a su vez puede favorecer la evolución de dicha cicatriz, la cual podría tener una organización más apropiada para la reconexión, en presencia de la quitosana intraparenquimal. Por otro lado, encontramos que la quitosana provocó un retraso temporal en el proceso de muerte neuronal y asociado a ello, una disminución de la misma.

Al tratarse de un implante moldeable y de elevada porosidad como lo es un hidrogel, una vez presente en el parénquima cerebral empieza a impregnarse con los fluidos

tisulares, y así permite restaurar la comunicación química entre los bordes de la herida, cuya interrupción tiende a secuestrar el área dañada del resto del tejido, posteriormente el implante es horadado por células endoteliales capilares y otras prolongaciones celulares, mediante un proceso de “colonización” en el tejido receptor. Este fenómeno fue observado con implantes intra-peritoneales de quitosana, en ellos se produjo desintegración gradual de este biomaterial y su reemplazo por diferentes estirpes celulares (Solls, 2002).

Estos cambios permiten suponer que al cabo de cierto tiempo la quitosana será degradada totalmente y eliminada por las vías hepática y renal (Onishi & Machida, 1999), sin causar ninguna toxicidad en los tejidos, especialmente por la acción enzimática de quitosinasas tisulares (Muzzarelli, 1996), lo que permitiría la reconexión nerviosa del área lesionada.

### **6. 3. LIMITACIONES Y PROPUESTAS.**

#### **A) Conductual:**

La prueba de análisis seleccionada para evaluar los efectos de la lesión y la presencia intraparenquimal de quitosana fue útil para reflejar el déficit motor, desafortunadamente no se lograron discriminar los efectos asociados a la presencia de quitosana sobre la restauración de las funciones motoras afectadas. Existen diferentes pruebas, como por ejemplo la frecuencia de uso de las extremidades, para evaluar la recuperación de la función, (Kozlowski, & Schallert, 1998; Kozlowski, James, & Schallert, 1996). Sin embargo, esta prueba no sería suficiente para discriminar los

efectos de algún tipo de implante o biomaterial en el cerebro, menos aún por la plasticidad que la rata posee para recuperarse ante cualquier tipo de daño cerebral de manera natural o espontánea (Zilles, 1990).

Resultaría importante desarrollar alguna prueba conductual para amplificar los efectos de los implantes cerebrales en un lapso de tiempo menor del que necesita la rata para recuperarse. De cualquier modo, esta limitación no quita validez a los hallazgos morfológicos aquí descritos.

#### **B) Morfológico:**

En este estudio se encontró que la quitosana redujo de manera importante la reactividad glial y conjuntamente la muerte neuronal, por lo tanto, no sólo fue bien tolerada, sino que al parecer, produjo efectos benéficos al inhibir la respuesta inflamatoria crónica, posiblemente al actuar como sustrato para deposición de proteínas de matriz extracelular y micro-andamiaje para el rebrote de neuritas y capilares neoformados. Por otro lado, se redujo la reactividad para laminina, elemento indispensable para que suceda neovascularización. Una de las alternativas para mejorar las propiedades reparativas de la quitosana sería la utilización de factores de crecimiento disueltos en ella, o la mezcla con otros componentes específicos de la lámina basal.

Una limitación de este estudio fue la imposibilidad para demostrar la integración de la quitosana en el tejido cerebral, debido a las técnicas histológicas utilizadas, que no permitieron observar las características de la interacción biomaterial-tejido; para

evitar la separación del implante de las rebanadas del tejido lesionado, necesariamente tendría que utilizarse otros procedimientos de inclusión del tejido con el implante, utilizando resinas epóxicas de alta dureza, de tal forma que se evitara la distorsión de la fuerza de corte por la diferente consistencia de la quitosana.

Para estudios futuros, del material incluido en resinas sería importante obtener imágenes de ultraestructura, tanto a nivel de microscopía electrónica de barrido para el análisis de superficies, como de microscopía electrónica de transmisión, para la identificación morfológica del linaje de las diferentes estirpes presentes en el interior del biomaterial.

Otra limitación fueron los tiempos de evaluación poslesión, al parecer insuficientes para que se formara una cicatriz más organizada, ocurriera el rebrote de neuritas, o para calcular la tasa de degradación del implante y la integración tisular gradual esperada. Para este propósito sería necesario tal vez sacrificar otros grupos de animales a diferentes intervalos de tiempo (cada 7 días), posiblemente hasta 5 meses, tiempo en el cual se produce la desaparición completa de otras formas compactas de tubos de quitosana en implantes intra-peritoneales, según lo observado en otros experimentos (Sollis, 2002).

Por otra parte, resultaría interesante evaluar las propiedades fisicoquímicas de este hidrogel, lo que nos permitiría deducir más acertadamente si la porosidad que presenta es la necesaria para facilitar la neovascularización o la extensión de prolongaciones neuronales. Pese a las limitaciones del presente estudio, es

importante hacer notar que se cumplieron los principales objetivos propuestos, basados en las siguientes observaciones:

- En todos los animales lesionados que recibieron el implante intracerebral del hidrogel de quitosana no se produjeron infecciones, ni procesos inflamatorios que no correspondieran al traumatismo quirúrgico y su evolución posterior, como se observó en el grupo de ratas que fueron también lesionadas, pero sin recibir el implante intracerebral de quitosana.
- Al momento de practicar la craneotomía se observó continuidad entre el tejido cerebral lesionado y el biomaterial, lo que sugiere que estaba integrándose, sin embargo no es posible demostrar esto por la incapacidad para analizar la interfase biomaterial-tejido, aparte de que no se han realizado otros estudios para calcular el tiempo que tarda la quitosana intracerebral en desaparecer.
- Parece ser que no se produjo una respuesta de rechazo a cuerpo extraño, lo que permite suponer que, dada la inestabilidad del material una vez presente en el tejido lesionado, este terminará por desaparecer completamente sin llegar a causar una reacción inmunológica retardada, esto debido a que la quitosana por si misma no posee la capacidad de generar anticuerpos específicos contra ella, y solo puede lograrse esto combinándola con lípidos, azúcares u otras proteínas (Minoru et al, 2001).
- Consideramos importante señalar que el método de esterilización por óxido de etilo fue el mejor de los métodos a utilizar, al no provocar alteraciones del arreglo molecular y de las propiedades físicas y químicas de la quitosana, tal como se ha reportado al utilizar el método de esterilización por vapor y presión



(Muller, 2005), por lo que este factor deberá tenerse en cuenta para la esterilización de otras formas de quitosana que pretendan utilizarse para otras aplicaciones biomédicas.

**En conclusión**, se puede decir que el objetivo de este trabajo fue alcanzado y respondió a las expectativas consideradas en la hipótesis, demostrando que este tejido presenta gran tolerabilidad a la quitosana. Por otro lado, este trabajo puede sustentar la conveniencia del uso de este biomaterial en el sistema nervioso; ya sea con fines reparativos o protectivos, sólo o en combinación con otros compuestos.

Este trabajo además permitirá realizar estudios que rebasen a los análisis *in vitro*. Si bien no se puede asegurar que la quitosana mejora y promueve los procesos reparativos, si puede considerarse un candidato importante para el desarrollo de esta área, ya que es posible conferirle mejores propiedades por manipulación físico-química, o al mezclarla con otro tipo de materiales orgánicos o sintéticos, así como factores tróficos para el tejido nervioso.

## VII. CONCLUSIONES

1. La quitosana aplicada en la corteza motora derecha de ratas lesionadas por aspiración, no modificó la recuperación natural que se produce en las habilidades motoras afectadas, evaluadas mediante la barra de equilibrio.
2. La aplicación intracerebral de quitosana retrasó la muerte neuronal en este modelo, y redujo la población neuronal afectada.
3. La reactividad de astrocitos disminuyó al aplicar quitosana intracerebral en los animales lesionados.
4. La reactividad microglial disminuyó en presencia del implante intracerebral de quitosana.
5. Hasta la última etapa poslesión analizada, la quitosana redujo la inmunoreactividad a laminina alrededor de los bordes de la herida, por lo que no favoreció la neovascularización.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- Abraham, H., & Lazar, G. (2000). Early microglial reaction following mild forebrain ischemia induced by common carotid artery occlusion in rats. *Brain Research*, 862, 63-73.
- Allan, G., Carroll, J. P., Delgado, E., Dutkiewicz, J., López-Dellamary, F., Hirabayashi, Y., et al. (1993). Biodegradable nonwovens from the sea. *INDA Journal*, 5 (1), 33-37.
- Angelova, N. (1999). Rationalizing the desing of polymeric biomaterials. *Trends of Biotechnology*, 17, 409-421.
- Banati, R., Gerhmann, J., & Schubert, P. (1993). Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7, 111-118.
- Berezovskaya, O., Maysinger, D., & Fedoroff, S. (1996). Colony stimulating factor-1 potential neuronal survival in cerebral cortex ischemic lesion. *Acta of Neuropathology* 92, 5479-5486.
- Bignami, A., & Dahl, D. (1976). Astroglial response immunofluorescences studies with antibody to astrocyte-specific protein (GFAP) in mammalian and submammalian vertebrates. *Neuropathology & Applications of Neurobiology*, 2, 99-111.
- Bovolenta, P., Wandosell, F., & Nieto-Sampedro, M. (1991). Neurite outgrowth over resting and reactive atrocytes. *Restaurative Neurology & Neurosciences*, 2, 221-238.
- Brandenberg, G., Leibrock, L., Shuma, R., Malette, W. G., & Quigley, H. (1984). Chitosan: a new topical haemostatic agent for diffuse capillary bleeding in brain tissue. *Neurosurgery*, 15 (1), 9-13.
- Brodkey, J. A. & Laywell, E. (1995). Focal Brain injury and up regulation of a developmentally regulated. *Journal of Neurosurgery*, 1, 106-112.
- Burns, D. (1998) Sistema Nervioso. En: Robbins, J. (Ed), *Patología*. (pp. 769-780). Lugar y editorial
- Cotton, A., & Gilbert, D. (1987). Production of superoxide by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Letters*, 223, 284-288.
- Chandy, T., Das, G. S., & Rao, G. H. (2000). 5-Fluorouracil-loaded chitosan coated polylactic acid microspheres as biodegradable drug carriers for cerebral tumours. *Journal of Microencapsulation*, 17 (5), 625-638.
- Chandy, T., & Sharma, C. P. (1990). Chitosan: as a biomaterial. *Biomater Artif Cells, Artificial Organs*, 18, 11-24.
- Chávez-Delgado, M. E., Mora-Galindo, J., Gómez-Pinedo, U., Feria-Velasco, A., Castro-Castañeda, S., López-Dellamary Toral, F., Luquín-De Anda, S., García-Segura, L. M., García-Estrada, J. (2003) Facial nerve regeneration through progesterone-loaded chitosan prostheses. A preliminary report. *Journal of Biomedical Material Research*, 706-711.
- Chávez-Delgado, M. E., Gómez-Pinedo, U., Feria-Velasco, A., Huerta-Viera, M., Castro-Castañeda, S., López-Dellamary Toral, F., Parducz, A., Luquín-De Anda, S., Mora-Galindo, J., García-Estrada, J. (2005) Ultrastrucural analysis of guide nerve regeneration using progesterone- and pregnelone-loaded chitosan prostheses. *Journal of Biomedical Material Research*, 74, 589-600.
- Chung, T. W., Yang, J., Akaike, T., Cho, K. W., Nah, J. W., Kim, S., et al. (2002). Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffolds for hepatocytes attachment. *Biomaterials*, 23 (14), 2827-2834.
- Dillon, G. P., Yu, X., Sridharan, A., Ranivieri, J., & Bellamkonda, R. V. (1998). The influence of physical structure and charge on neurite extensión in a 3D hydrogel scaffold. *Journal of Biomaterial Sciences Polymeric Engineering*, 9 (10), 1049-1069.

- Duvedev, R., Roof, R., Fülöp, Z., Hoffman, S., & Stein, D. (1995). Blood-brain barrier breakdown and edema formation following frontal cortical contusion: Does hormonal status play a role?. *Journal of Neurotraumatology*, 12 (1), 65-75.
- Elçin, E., Elçin, Y. M. & Pappas, G. D. (1998). Neural tissue engineering: adrenal chromaffin cell attachment and viability on chitosan scaffolds. *Neurology Research*, 20, 7648-7654.
- Elçin, Y. M., Dixit, V., & Gitnick, G. (1998). Hepatocyte attachment on biodegradable modified chitosan membranes: in vitro evaluation for the development of liver organoids. *Artificial Organs*, 22, 10837-10846.
- Eng, L., & Shiurba R. (1988). Glial fibrillary acidic protein. A review of structure, function and clinical application. En: P. J. Marangos, I. Campell, & R. Coben (Eds.) *Vol. 2, Neurobiological Research*. (pp 635-684). New York: Academic Press.
- Escott, G., & Adams, D. (1995). Chitinase activity in human serum and leukocytes. *Infectology and Immunology*, 63, 4770-4773.
- Fagan, A. M. & Gage, F. A. (1994). Mechanisms of sprouting in the adult central nervous system: cellular response in areas of terminal degeneration and reinnervation in the rat hippocampus. *Journal of Neurosciences*, 58 (4), 705-725.
- Fawcett, J., & Ascher, R. (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain Research Bulletin*, 49 (6), 377-391.
- Feeney, D. M., Gonzalez, A., & Law, W. A. (1982). Amphetamine, haloperidole and experience interact to affect after motor cortex injury. *Science*, 217, 855-857.
- Filder, P., Schuette, K., Asher, R., Dobbertin, A., Thornton, S., Calle-Patino, Y., et al. (1999). Comparing astrocytic cell lines they are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2. *Journal of Neurosciences*, 19 (20), 8778-8788.
- Frei, K., Sielp, C., & Grosmith, P. (1987). Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon  $\gamma$ -treated microglia cells. *European Journal of Immunology*, 12, 237-243.
- García, J. H., Liu, K. F., & Ho, K. L. (1995). Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke*, 26, 636-642.
- García-Estrada, J., Luquín, S., Fernández, M. A. & García-Segura, L. M. (1999). Dehydroepiandrosterone, pregnenolone and sex steroids down-regulate reactive astroglia in male rat brain after a penetrating brain injury. *Int Journal of Development Neuroscience*, 17, 145-151.
- Geisert, E. E., & Stewart, A. M. (1991). Changing interaction between astrocytes and neurones during CNS maturation. *Developmental Biology*, 143, 335-345.
- Gerhmann, J., Matsumoto, Y., & Kreutzberg, G. (1995). Microglia intrinsic immunoeffector cell of the brain. *Brain Research Review*, 20, 269-287.
- Gillum, R. F. (1995). Epidemiology of stroke in Hispanic Americans. *Stroke*, 26, 1707-1711.
- Gómez-Pinedo, U., Chávez-Delgado, E., López-Dellamary, F., Mora-Galindo, J., González-Pérez, O., Martínez-Contreras, A., et al. (2001). Utilización de prótesis de quitosana y silicona en la regeneración del nervio ciático axotomizado de ratas. *Archivos de Neurociencias*, 6 (4), 184-193.
- González-Pérez, O., González- Castañeda, R. E., Huerta, M., Luquín, S., Gómez-Pinedo, U., Sánchez-Almaraz, E., Navarro-Ruiz, A. & García-Estrada, J. (2002) Beneficial Effects of  $\alpha$ -Lipoic acid plus vitamin E on neurological deficit, reactive gliosis and neuronal remodeling in the penumbra of the ischemic rat brain. *Neurosciences Letters*, 321, 100-104.
- Gringas, M., Paradis, I. & Berthod, F. (2003). Nerve regeneration in a collagen-chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice. *Biomaterials*, 24 (9), 1635-1661.

- Haipeng, G., Yinghui, Z., Jianchun, L., Yandao, G., Nanming, Z., & Xiufang, Z. Studies on nerve cells affinity of chitosan derived materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52 (2), 285-295.
- He, P., Davis, S. S., & Illum, L. (1999). Chitosan microsphere prepared by spray drying. *Journal of Pharmacology*, 30, 153-165.
- Hoffman, S., Fülöp, Z., & Stein, D. (1994). Bilateral frontal cortical contusion in rats: behavioral and anatomic consequences. *Journal of Neurotraumatology*, 11 (4), 417-431.
- Hozumi, I., Chin, F., & Norton, W. (1990). Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds. *Brain Research*, 524, 64-71.
- Hsiung, G., Y., Sadovnick, D. & Fedelman, H. (2004). Apolipoprotein E4 genotype as a risk factor for cognitive decline and dementia: data from the Canadian study of health and aging. *CMJA*, 12, 171-178.
- Hubbell, J. (1990). Bioactive biomaterials. *Current Opinion of Biotechnology*, 10, 123-129.
- Ishihara, M., Nakanishi, K., Ono, K., Sato, M., Kikuchi, M., Saito, Y., et al. (2002). Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in a healing process. *Biomaterials*, 23, 833-840.
- Jacobson, S. (1972). Neurocytology. In: B. Curtis, S. Jacobson, & E. Marcus. (Eds.) *An Introduction to the Neurosciences*. (pp 36-76), W B Saunders.
- Jameela, S. R., Kumary, T. V., Lal, A. V., & Jayakrishnan, A. (1998). Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting controlled delivery system. *Journal of Controlled Release*, 52, 217-224.
- Jayakrishnan, A., & Jameela, S. R. (1995). Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. *Biomaterials*, 16, 769-775.
- Jensen, M., González, B., Castellano, B., & Zimmer, J. (1994). Microglial and astroglial reaction to anterograde axonal degeneration: a histological and immunocytochemical study of the adult rat fascia dentata after entorhinal perforant path lesion. *Brain Research*, 98, 245-260.
- Jorgensen, O. S., Hansen, L. I., Hoffman, S. W., Fülöp, Z., & Stein, D. G. (1997). Synaptic remodeling and free radical formation after brain contusion injury in the rat. *Experimental Neurology*, 144, 326-338.
- Kikuchi, K., Nishino, K., & Ohyu, H. (2000). Increasing CNS norepinephrine level by the precursor L-DOPS facilitate beam-walking recovery after sensorimotor cortex ablation in rats. *Brain Research*, 860, 130-135.
- Klokkevold, P. R., Lew, D. S., Ellis, D., & Bertoami, C. (1992). Effect of chitosan on lingual homeostasis in rabbits with platelet dysfunction induced endoprostheses. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 50, 41-45.
- Kozlowski, D. A., & Schallert, T. (1998). Relationship between dendritic pruning and behavioral recovery following sensorimotor cortex lesion. *Behavioral Brain Research*, 97, 89-98.
- Kozlowski, D. A., James, D. C., & Schallert, T. (1996). Use dependent exaggeration of neural injury after unilateral sensorimotor cortex lesion. *Journal of Neuroscience*, 15 (15), 4776-4786.
- Kratz, G., Arnander, C., Swedenborg, J., Bäck, M., Falk, C., Gouda, I., et al. (2000). Heparin-chitosan complexes stimulate wound healing in human skin. *Scandinave Journal of Plastic Reconstruction Surgery and Hand Surgery*, 31, 21192-2123.
- Kriegelstein, J. (1997). Excitotoxicity and neuroprotection. *European Journal of Pharmacology Sciences*, 5, 181-187.
- Lafuente, J. V., & Zarranz, J. J. (1998). Biopatología de los traumatismos craneoencefálicos: modelos experimentales. *Revisiones de Neurología*, 26 (150), 224-232.

- Lee, K. Y., Ka, W. S., & Park, W. H. (1995). Blood compatibility and biodegradability of partially n-acetylated chitosan derivatives. *Biomaterials*, *15*, 1211-1216.
- Lighthal, J., Dixon, C., & Anderson, T. (1989). Experimental models of brain injury. *Journal of Neurotraumatology*, *6*, 83-97.
- Luquín S. (1995). *Hormonas gonadales y plasticidad neuroglial en la rata adulta. Tesis de doctorado no publicada*. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Manthorpe, M., Engvall, E., Ruoslahti, E., Longo, F. M., Davis, G. E., & Varon, S. (1983). Laminin promotes neurite regeneration from cultured peripheral and central neurons. *Journal of Cellular Biology*, *97*, 1882-1890.
- Marty, S., Dussart, I., & Peschanski, M. (1991). Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS microglia/macrophages. *Neurosciences*, *45*, 529-539.
- Mattson, A., & Levin, H. (1990). Frontal lobe dysfunction following closed head injury: Are view of the literature. *Journal of Nervous Mental Disease*, *178*, 282-291.
- Made, C. & Holzer, M. (2004). Brain function after resuscitation from cardiac arrest. *Current Opinion of Critical Care*, *10*, 213-217.
- McKerracher, L., (2001). Spinal cord repair: strategies to promote axon regeneration. *Neurobiology Disease*, *8*, 11-18.
- Merril, J. (1992). Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin 1 and related cytokines in brain development: normal and pathological. *Developmnet of Neuroscience*, *14*, 1-10.
- Mi, F. L., Shyu, S. S., Chen, C. T., & Schoung, J. Y. (1990). Porous chitosan microsphere for controlling the antigen release of Newcastle disease vaccine: preparation of antigen-adsorbed microspheres and *in vitro* release. *Biomaterials*, *20*, 603-612.
- Mittal, S., Cohen, A., & Maysinger, D. (1994). In vitro effects on brain derived neutrophic factor released from microsphere. *Neuroreport*, *5*, 2577-2582.
- Müller, I. (2005) Análisis químico en laboratorio En: Acribia (Ed.), *Gula Básica*. (pp 111-113).
- Muzzarelli, R. (1996). Human enzymatic activities related to therapeutic administration of chitin derivatives. *CLMS*, *53*, 131-41.
- Muzzarelli, R. (1993). Biochemical significance of exogenous chitin in animals and patients: *Carbohydrate Polymers*, *20*, 7-16.
- Muzzarelli, R. (1977). Medical aplications In: Muzzarelli (Ed.), *Chitin*, (pp 655-667), New York, USA. Pergamon Press Ltd.
- Neafsey, E. (1990). The complete ratunculus: output organization of layer V of the cerebral cortex. In: B. Kolb & R. Tees, (Eds.) *The cerebral Cortex of Rat* (pp:199-212) Massachusetts US, Bradford Book, MIT press.
- Needleman, I. G., Martin, G., & Smales, F. C. (1998). Characterization of bioadhesives for periodontal and oral mucosal drug delivery. *Journal of Clinical Periodontology*, *25*, 174-184.
- Okamoto, Y., Watanabe, M., Miyatake, K., Morimoto, M., Shigemasa, Y., Minami. (2001) Effects of chitin/chitosan and their oligomers/monomers on migration of fibroblast and vascular endothelium cells. *Biomaterials*,
- Onishi, H., & Machida, Y. (1999). Biodegradation and biodistribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials* *20*, 175-182.
- Otero-Corona-Vázquez, T. (1997). Frecuency of motor neuron disease in a México city referral center. *Revista de Investigación Clínica*, *49*, 445-448.
- Peluso, G., Petillo, O., Ranieri, M., Santin, M., Ambrosio, L., Calabro, D., et al. (1994). Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials*, *15* (15), 1215-1220.

- Peppas, N. A., & Langer, R. (1994). New challenges in biomaterials. *Science*, 253 (5154), 1715-1720.
- Pravdenkova, S., Basnakian, A., James, S., & Andersen, B. (1996). DNA fragmentation and nuclear endonuclease activity in rat brain after severe closed head injury. *Brain Research*, 729, 151-155.
- Rao, B. S., & Sharma, C. P. (1997). Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *Journal do Biomedical Material Research*, 34, 21-28.
- Riva-Depaty, I., Fardeau, C., Mariani, J., & Bouchard, C. (1994). Contribution of peripheral macrophages and microglia to the cellular reaction after mechanical or neurotoxin-induced lesions of the rat brain. *Experimental of Neurology*, 128, 77-87.
- Robbins. Inflamación y Recuperación. (1998). In: Robbins, (Ed.) *Patología*. (pp 39-82).
- Rogers, D., & Hunter, J. (1996). Photothrombotic lesions of the rat cortex impair acquisition of the water maze. *Pharmacology Biochemical and Behavior*, 56, 747-754.
- Sakiyama, S. E., Schensen, J. C., & Hubell, J. A. (1999). Incorporation of heparin-binding peptides into fibrin gels enhances neurite extension: an example of designer matrices in tissue engineering. *FASEB Journal*, 13 (15), 2214-2224.
- Salhia, B., Angelov, L., Roncari, L., Wu, X., Shannon, P., & Guha, A. (2000). Expression of vascular endothelial growth factor by reactive astrocytes and associated neoangiogenesis. *Brain Research*, 883, 87-97.
- Sandvig, A., Berry, M., Barret, L. B., Butt, A. & Logan, A. (2004). Myelin-, reactive glia- and scar derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia*, 46, 225-251.
- Sato, M., Chang, E., Igarashi, T., & Noble, L. (2001). Neuronal injury loss after traumatic brain injury variability. *Brain Research*, 917, 45-54.
- Schmidt, C. E., Shastri, V. R., Vacanti, J. P., & Langer, R. (1997). Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conductive polymer. *Proc National Academy Science*, 97, 8948-8953.
- Shepherd, R., Reader, S., & Falshaw, A. (1997). Chitosan functional properties. *Journal of Glycoconjugated*, 14, 4535-4542.
- Silver, J. & Miller, J. H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews of Neurosciences*, 5, 146-156.
- Solis, R. (2002). Estudio de la respuesta inmune en ratas, por la presencia prolongada de implantes intra peritoneales del biomaterial quitosana. *Tesis de maestría no publicada*. Maestría y Doctorado en Inmunología del Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jal., México
- Speziale, N. (1991) Inflamación. En: Margi (Ed.) *Fundamentos de inmunología e inmunquímica* (pp 471-72). Editorial Panamericana.
- Stichel, C. C., & Müller, H. W. (1998). Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic-central nervous system injury. *Progress in Neurology*, 56, 119-148.
- Stoll, G., & Jander, S. (1999). The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Progress in Neurobiology*, 58, 233-247.
- Stoll, G., Jander, S., & Schroeter, M. (1998). Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Progress in Neurobiology*, 56, 149-171.
- Stone, C. A., Wright, H., Clarke, T., Powell, R. & Devaraj, V. S. (2000). Healing at skin graft donor sites dressed with chitosan. *British Journal of Plastic Surgery*, 53 (7), 601-606.
- Streit, W., Jalter, S., & Pennell, N. (1997). Reactive Microgliosis. *Progress in Neurobiology*, 57, 563-581.

- Süheyla, K. (1997). Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *Microencapsulation*, 14, 689-711.
- Teng, Y. D., Lavik, E. V., Quo, X., Park, K. I., Ourednik, J., Zarakowski, D., et al. (2000). Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *PNAS*, 99 (5), 3024-3029.
- Tilling, T. (1998). Basement membrane proteins influences brain capillary endothelial barrier function In vitro. *Journal of Neurochemical Research*, 71(3), 1151-1157.
- Timpl, R. (1989). Structure and biological activity of basement membrane protein. *European Journal of Biochemical*, 180, 487-502.
- Tohimada, K., & Ikada, Y. (1997). In vitro and in vivo degradation films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials*, 18, 567-575.
- Topp, K., Faddis, B., & Vijayan, V. (1989). Trauma-induced proliferation of astrocytes in the brains of young and aged rats. *Glia*, 2, 201-211.
- Tsai, G. J., & Su, W. H. (1999). Antibacterial activity of shrimp chitosan against Escherichia Coli. *Food Prot*, 62, 239-243.
- Vazquez-Chona, F., & Geisert, E. E. (1999). N-cadherine at the glial scar in the rat. *Brain Reserch*, 838, 45-50.
- Wan, A. C., Knor, E., & Hastings, G. W. (1997). Hydroxyapatite modified chitin as a potential hard tissue substitute material. *Journal of Biomedical Material Research*, 38, 3235-3241.
- Wein, Lao, & Gu, (2001)
- Weinstein, D., Shelanski, M., & Lien, R. (1991). Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *Journal of Cellular Biology*, 112, 1205-1213.
- Woerly, S., Petrov, P., Sykova, E., Roitbak, T., Simonova, Z., & Harvey, A. R. (1999) Neural tissue formation within porous hydrogels implanted in brain and spinal cord lesions: ultrastructural, immunohistochemical, and diffusion studies. *Tissue Engineering*, 5, 5467-5488.
- Yamada, K. M. (1999). Fibronectin and others cell interactives glycoproteins. In E. d. Ha (Ed.) *Cell biology of extracellular matrix* (2nd ed., pp111-148). New York: Plenum Pres.
- Yanaka, K., Camarata, P. J., Spellman, S. R., Skubitz, A. P., Furcht, L. T., y Low, W. C. (1997). Laminin peptide ameliorates brain injury by inhibiting leukocyte accumulation, a rat model of transient focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism*, 17 (6), 605-611.
- Yong, V. W. (2002) Mental retardation and developmental disabilities research, *Journal of Developmental disabilities research*, 4, 193-199.
- Zilles, K. (1990). Anatomy of the neocortex: Cytoarchitecture and myeloarchitecture. In: B. Kolb & R. Tees (Eds.), *The cerebral Cortex of Rat*. (pp: 199-212). Massachusetts US: Bradford Book, MIT press.