

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Ciencias Biomédicas



“Estudio del uso combinado de biomateriales y ácido lipoico con fines neuroregenerativos en un modelo experimental de lesión cortical”

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Dña. Brenda Rocamonde Esteve

Dirigida por: Dr. D. José Miguel Soria López

VALENCIA

2013

Esta tesis ha sido realizada gracias a la ayuda de:

Fundación MAPFRE, Fundación Ramón Areces, Programa de ayudas a la investigación Banco Santander-Universidad Cardenal Herrera-CEU.

AGRADECIMIENTOS

Hace exactamente 15 años, en un día como este, me encontraba sentada delante de la tele, viendo uno de esos programas de ciencia, en el que aparecía una chica hablando sobre algo que yo, por aquel entonces, no acababa de comprender, pero era algo que consiguió despertar la fascinación y la curiosidad en mí. A pie de pantalla aparecían unos rótulos que decían: “Doctora en Biología”. Y fue entonces cuando descubrí lo que quería ser “de mayor”.

Sé que esta decisión dio muchos quebraderos de cabeza a mis padres, que querían que “la niña” estudiara medicina, pero yo tenía otras ideas en mente. Ahora puedo afirmar que están orgullosos de la decisión que entonces tomé y deberían estar contentos, porque al final voy a ser doctora, aunque no de la clase que ellos querían, pero nadie es perfecto.

Siendo solo una ignorante estudiante de carrera descubrí (gracias a mi amigo Marcelo) a una persona que fue motivo de admiración desde el primer segundo. Verdugo, no necesita más presentación, esas 7 letras encierran la esencia de un grandísimo científico que me ha enseñado grandes lecciones y con el que, increíblemente, he tenido la suerte de trabajar.

Finalmente, al acabar la carrera y conseguí meterme en un laboratorio donde conocí a Misi, Paco y Geli. Y fue así como el destino, o una llamada de José Miguel Soria más bien, me obsequió con esta gran oportunidad. Él ha sido quien me ha dirigido en este camino, ha sido mi motor y mi motivación todo este tiempo y gracias a él he vivido experiencias que nunca olvidaré.

Y entonces conocí a Teresa Catalán, mi fiel compañera en los comienzos que tubo la bondad y la paciencia de enseñarme todos los entresijos del laboratorio. A “los de abajo”, a los cuales evitaré nombrar uno a uno porque seguro que me dejaría a alguien y quedaría muy feo, ellos son los pilares que sostienen la ciencia aunque nadie los vea. A Nacho Pérez, Enric Poch, Maria Miranda, Javier Romero, con su talante y sabiduría, ellos que llevan ya un tiempo en este mundillo y nos han honrado alguna vez con alguno de sus consejillos. A Jorge Barcia, que me inspiró con el verdadero espíritu de la ciencia. A las chicas de la FOM, Leticia y Diana, que me enseñaron cosas fundamentales en esta vida, como que nunca hay que dejar ni parafina ni “otras cosas” en la guantera de un coche. A Emma y Siv con nuestras interminables horas en el confocal. A las chicas de Verdugo, que tanto me han ayudado. A Xavi i els seus xics, encara que fa molt de temps no vos oblide, pero ja sabeu, si pregunten, han sigut els gnomos. Simon and the guys, that gave me the best of the experiences, they showed me how big is the world and that there is hope out there. You were right, it's getting better.

A todos ellos quiero darles las gracias, gracias a estas personas que, de alguna manera, en mayor o menor medida, han formado parte de esta gran aventura y me han hecho aprender, de una manera u otra, a ser mejor persona.

Quiero agradecer también a mi familia, a mi hermano que me ha apoyado desde la sombra de la cueva, a mis yayos que han estado siempre a mi lado, y a mis amigos, one of the golf balls of my glass.

Pero en esta vida, el camino que recorreremos hasta nuestros sueños está lleno de obstáculos que alguna vez nos han hecho tropezar y hasta caer, y en mi caso he tenido la suerte de contar con una persona que ha estado a mi lado todo este tiempo, apoyándome más de lo que jamás hubiera podido desear y que cada vez que caía me ayudaba a levantarme con más fuerza. Sergio del Rio, no tendré tiempo suficiente en esta vida para agradecerte todo lo que has hecho por mí.

GRACIAS

La gota horada la roca, no por su fuerza, sino por su constancia.

*En el verdadero éxito, la suerte no tiene nada
que ver; la suerte es para los improvisados y
aprovechados; y el éxito es el resultado obligado
de la constancia, de la responsabilidad, del
esfuerzo, de la organización y del equilibrio
entre la razón y el corazón.*

ABREVIATURAS

h: horas

min: minutos

seg: segundos

rpm: revoluciones por minuto

M: molar

mM: mili molar

L: litros

mL: mililitros

μ L: microlitros

mm: milímetros

μ m: micrómetros

nm: nanómetros

μ g: microgramos

Ø: diámetro

UV: ultravioleta

ÍNDICE

| | |
|---|----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. La corteza cerebral | 3 |
| 1.1. Estructura de la corteza cerebral..... | 3 |
| I. <i>Molecular capa (capa plexiforme)</i> | 4 |
| II. <i>Capa granular externa</i> | 4 |
| III. <i>Capa piramidal externa</i> | 4 |
| IV. <i>Capa granular interna</i> | 4 |
| V. <i>Capa piramidal interna (capa ganglionar)</i> | 4 |
| VI. <i>Capa multiforme (capa de células polimórficas)</i> | 4 |
| 1.2. Definición y clasificación de las células en el Sistema Nervioso Central | 4 |
| a) <i>NEURONAS</i> | 5 |
| b) <i>CÉLULAS GLIALES</i> | 6 |
| I. <i>Macroglía</i> | 6 |
| II. <i>Microglía</i> | 8 |
| c) <i>CÉLULAS EPENDIMARIAS</i> | 9 |
| 2. Lesiones cerebrales..... | 10 |
| 2.1. Lesión primaria y secundaria..... | 10 |
| 2.2. <i>Modelo de criolesión</i> | 11 |
| 3. Estrés oxidativo y radicales libres..... | 12 |
| 3.1. Papel fisiológico de los radicales libres | 12 |
| 3.2. Los radicales libres en las lesiones cerebrales | 13 |
| 3.3. Radicales libres y barrera hematoencefálica..... | 14 |
| 3.4. Defensa antioxidante | 14 |
| 3.4.1. <i>El sistema glutatión</i> | 15 |
| 4. Antioxidantes | 15 |
| 4.1. El ácido lipoico como antioxidante | 15 |
| 4.1.1. <i>Propiedades del ácido lipoico</i> | 16 |
| 4.1.2. <i>Uso terapéutico del ácido lipoico en el sistema nervioso</i> | 17 |
| 5. Capacidad regenerativa del sistema nervioso | 17 |
| 5.1. Neurogénesis en el estado adulto | 18 |
| 5.1.1. <i>Neurogénesis en la zona subventricular</i> | 19 |
| 5.2. Capacidad migratoria de las células madre neurales..... | 20 |
| 6. Estrategias neurorregenerativas..... | 21 |
| 6.1. Utilización de biomateriales en estrategias regenerativas | 22 |
| 6.2. Propiedades relevantes de los biomateriales..... | 22 |
| I. <i>Propiedades biológicas</i> | 22 |
| II. <i>Propiedades físico-químicas</i> | 22 |
| III. <i>Propiedades mecánicas</i> | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 6.3. Aplicación de biomateriales en el Sistema Nervioso..... | 24 |
| HIPÓTESIS | 27 |
| OBJETIVOS..... | 31 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 35 |
| 1. Estabulación y manejo de los animales..... | 37 |
| 2. Diseño experimental y metodología | 37 |
| 2.1. Modelo de criolesión..... | 37 |
| 2.2. Administración de ácido lipoico | 38 |
| 2.3. Administración de bromodesoxiridina (BrdU)..... | 39 |
| 2.4. Estudio de la capacidad angiogénica del ácido lipoico | 39 |
| 2.5. Implante del biomaterial | 40 |
| 3. Obtención y procesado de muestras | 41 |
| 3.1. Obtención de muestras para determinaciones bioquímicas..... | 41 |
| 3.2. Obtención de muestras para inmunohistoquímicas | 41 |
| 3.2.1. <i>Perfusión con paraformaldehído al 4%</i> | 41 |
| 3.3. Obtención de muestras para microscopía electrónica | 42 |
| 4. Procedimientos y técnicas | 42 |
| 4.1. Tinción de hematoxilina-eosina | 42 |
| 4.2. Determinaciones bioquímicas | 43 |
| 4.2.1. <i>Determinación de proteínas (Método de Lowry)</i> | 43 |
| 4.2.2. <i>Determinación de glutatión</i> | 44 |
| 4.2.3. <i>Determinación de la capacidad antioxidante</i> | 45 |
| 4.2.4. <i>Electroforesis y Western blotting</i> | 46 |
| 4.3. Técnica de TUNEL | 48 |
| 4.4. Determinaciones inmunohistoquímicas..... | 48 |
| 4.4.1. <i>Inmunohistoquímica para BrdU</i> | 48 |
| 4.4.2. <i>Inmunohistoquímica para Iba1</i> | 50 |
| 4.4.3. <i>Inmunohistoquímica de fluorescencia</i> | 50 |
| 5. Estudio mediante resonancia magnética 7T..... | 51 |
| 5.1. Estudio anatómico | 52 |
| 5.2. Estudio funcional | 52 |
| 6. Obtención y tratamiento de los resultados | 52 |
| 6.1. Obtención de imágenes..... | 52 |
| 6.1.1. <i>Microscopía de campo claro</i> | 52 |
| 6.1.2. <i>Microscopía de fluorescencia y confocal</i> | 53 |
| 6.1.3. <i>Microscopía electrónica de transmisión</i> | 53 |
| 6.2. Contaje y análisis estadístico | 53 |
| RESULTADOS | 55 |
| 1. Estudio del tratamiento con ácido lipoico tras el modelo de criolesión..... | 57 |
| 1.1. Efecto del ácido lipoico sobre el tejido cerebral | 57 |

| | |
|--|------------|
| 1.2. Caracterización del modelo de criolesión | 58 |
| 1.2.1. <i>Estudio histológico de la zona afectada</i> | 58 |
| 1.3. Estudio citológico de la zona lesionada..... | 61 |
| 1.3.1. <i>Efecto del ácido lipoico sobre la supervivencia celular</i> | 61 |
| 1.3.2. <i>Estudio de la proliferación y la diferenciación</i> | 61 |
| 1.3.3. <i>Estudio angiogénico tras el tratamiento</i> | 62 |
| 1.3.4. <i>Reactividad astrogial tras el tratamiento</i> | 64 |
| 1.3.5. <i>Respuesta microglial</i> | 66 |
| 1.4. Estudio molecular de pCREB y BDNF | 67 |
| 2. Estudio del uso combinado de biomateriales y ácido lipoico tras el modelo de criolesión | 68 |
| 2.1. Estudio histológico de la implantación del biomaterial | 68 |
| 2.2. Estudio de la angiogénesis en el interior del biomaterial | 70 |
| 2.3. Estudio de la reactividad glial dentro del biomaterial | 71 |
| 2.3.1. <i>Estudio de la astroglia</i> | 71 |
| 2.3.2. <i>Estudio de la microglía</i> | 73 |
| 2.5. Estudio del crecimiento neuronal | 75 |
| 2.6. Estudio mediante resonancia magnética..... | 77 |
| 2.6.1. <i>Estudio funcional</i> | 77 |
| 2.6.2. <i>Estudio estructural</i> | 77 |
| DISCUSIÓN | 79 |
| CONCLUDING REMARKS | 89 |
| EXTENDED SUMMARY | 93 |
| BIBLIOGRAFÍA | 129 |
| ANEXO I | 157 |

INTRODUCCIÓN

1. La corteza cerebral

1.1. Estructura de la corteza cerebral

La corteza cerebral de los mamíferos es una estructura extremadamente compleja en la que los órganos sensoriales diferentes están representados en algunas zonas o áreas conocidas como áreas sensoriales primarias. Desde el sentido del olfato para la visión, cada modo tiene su propio territorio sensorial cortical, que mantiene una zona relativamente constante en todos los mamíferos (Valverde, 2002, Bear et al., 2007). Además de estas áreas sensoriales primarias, la corteza cerebral tiene múltiples áreas secundarias somáticas, de asociación y motoras, en las que los diferentes sistemas corticales aferentes y de asociación producen finalmente respuestas complejas en el aprendizaje, la memoria y el comportamiento (Squire et al., 2012). La organización de esta estructura, desde nuestra perspectiva humana, adquiere su máxima complejidad en el hombre, es el resultado de un lento proceso evolutivo que pudo haber comenzado hace 150 millones de años en el supuesta transición reptil-mamífero (Jerison, 1970).

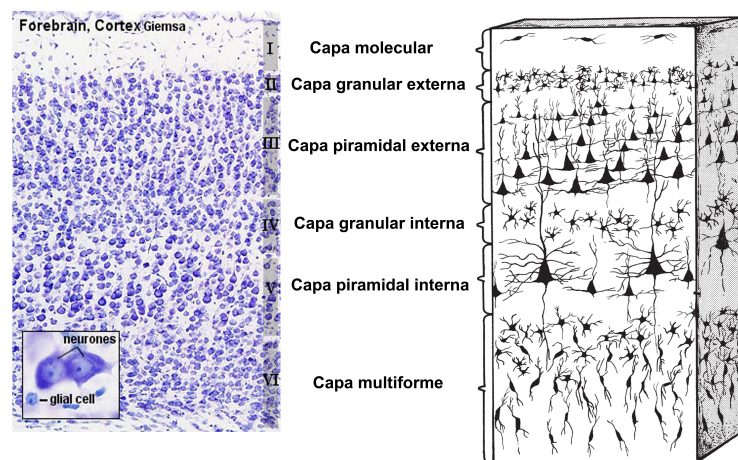


Figura 1. Tinción de Giemsa de la corteza cerebral, en la que se puede distinguir la distribución en capas. Puede observarse como las neuronas presentan un tamaño celular mucho mayor que las células gliales (izquierda). Esquema de la distribución neuronal en capas de la corteza, como se observaría tras una tinción de Golgi (derecha) (Wills et al., 2011).

El neocórtex es la corteza más avanzada o evolucionada, en el hombre ocupa la mayor parte de la corteza cerebral y representa una gran complejidad estructural (Jerison, 1977, Bear et al., 2007). Desde un punto de vista funcional, el neocórtex se asocia con características de integración más complejas y, en el caso del hombre también se asocia con mayores funciones intelectuales (inteligencia, la capacidad para resolver los problemas). Es posible distinguir la

presencia de 6 capas de diferentes tipos de neuronas, que determina una organización horizontal y vertical de fibras (Kiernan and Steel, 2000, Valverde, 2002). Fue precisamente Ramón y Cajal quien hizo por primera vez una descripción completa de la organización intrínseca de la corteza cerebral del hombre y de los vertebrados, que muestra la estructura y conexiones de diferentes tipos de neuronas, su organización dendrítica y axonal, y la disposición del plexo de fibras aferente y eferente (Figura 1).

El neocórtex está dividido en seis capas basándose en la densidad celular y en la disposición:

I. Molecular capa (capa plexiforme): Es el estrato más superficial que se encuentra cubierto por piamadre. Es un estrato de asociación intracortical. Contiene principalmente fibras nerviosas que derivan de las dendritas apicales de las neuronas piramidales subyacentes y de los axones de las neuronas piramidales invertidas. También llegan aquí algunos axones provenientes del tálamo y de fibras comisurales (Kiernan, 2000).

II. Capa granular externa: estrato de asociación intracortical. Las dendritas de estas neuronas terminan en la capa molecular, mientras que sus axones se dirigen a las capas más profundas y algunos pasan a la sustancia blanca. Contiene un gran número de pequeñas células piramidales y estrelladas (Kiernan, 2000).

III. Capa piramidal externa: estrato de asociación intracortical. Las dendritas de estas neuronas también terminan en la capa molecular, sus axones se dirigen a las capas más profundas, proyectándose luego hacia otras áreas corticales, especialmente las del hemisferio del lado opuesto. Esta capa está compuesta de células piramidales (Kiernan, 2000).

IV. Capa granular interna: estrato receptor de proyección, porque recibe impulsos desde la región subcortical, específicamente del tálamo, las que se distribuyen por este cuarto estrato en forma de estrías, denominadas Estrías Tálamo Corticales (Kiernan, 2000). Esta capa está compuesta de células estrelladas dispuestas en un diseño muy compacto (Squire et al., 2012).

V. Capa piramidal interna (capa ganglionar): estrato efector de proyección. Aquí existe una banda de fibras conocida como banda interna de Baillarger. En la corteza motora primaria las neuronas de Betz dan origen a parte del haz corticoespinal. Esta capa contiene grandes células piramidales y de tamaño medio (Kiernan, 2000, Bear et al., 2007).

VI. Capa multiforme (capa de células polimórficas): estrato de asociación interhemisférico, cuyos axones van a formar parte del cuerpo calloso. Aunque la mayoría de las células son fusiformes, muchas son células piramidales modificadas cuyo cuerpo celular es triangular u ovoide. También se encuentran células de Martinotti (Kiernan, 2000).

1.2. Definición y clasificación de las células en el Sistema Nervioso Central

La corteza cerebral contiene, aparte de células neurogliales y vasos, células nerviosas o neuronas y fibras nerviosas organizadas en capas paralelas. (Kiernan, 2000). Cada capa tiene su

propia individualidad, dada por variedades celulares específicas y por sus conexiones, pero ha de señalarse que estas capas no operan de forma aislada: los elementos que las caracterizan están íntimamente relacionados con los componentes de las otras capas corticales, siendo ésta la filosofía sobre la que se han desarrollado modernos conceptos de operación modular de la corteza, la cual es contemplada como una organización funcional de grupos celulares verticalmente ensamblados en torno a un eje central representado por fibras aferentes corticales (Szentagothai, 1983, Squire et al., 2012).

El sistema nervioso central está formado principalmente por tres tipos celulares: las neuronas, las células gliales y las células endoteliales:

a) NEURONAS: son las células encargadas de transmitir el impulso nervioso a través de todo el sistema nervioso. Existen diferentes tipos de neuronas según su morfología y función (Figura 2).

Sin embargo, la estructura general es en todas la misma. Estas están formadas por un soma o cuerpo celular, el cual contiene el núcleo. Desde este soma se proyectan dos tipos de prolongaciones llamadas neuritas: las dendritas y los axones (Ramón y Cajal, 1988). Las dendritas son de mayor grosor que los axones, tienen una composición similar a la del soma y reciben el impulso nervioso, el cual viaja hasta el soma. Por otro lado, los axones son los encargados de transmitir el impulso nervioso desde el soma hasta el cono sináptico, modulado por neurotransmisores (Nieuwenhuys, 2009).

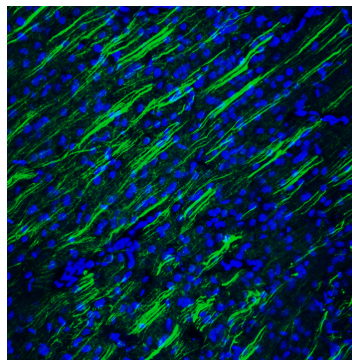


Figura 2. Neuronas de la corteza cerebral de una rata marcadas con el anticuerpo MAP2.

El número, la longitud y la forma de la ramificación de las neuritas brindan un método morfológico para clasificar a las neuronas:

i. Neuronas unipolares: tiene un cuerpo celular que tiene una sola neurita que se divide a corta distancia del cuerpo celular en dos ramas, una se dirige hacia alguna estructura periférica y otra ingresa al SNC. Las dos ramas de esta neurita tienen las características estructurales y funcionales de un axón. En este tipo de neuronas, las finas ramas terminales halladas en el extremo periférico del axón en el sitio receptor se denominan a menudo dendritas.

ii. Neuronas bipolares: poseen un cuerpo celular alargado y de cada uno de sus extremos parte una neurita única. Ejemplos de neuronas bipolares se hallan en los ganglios sensitivos coclear y vestibular.

iii. Neuronas multipolares: tienen algunas neuritas que nacen del cuerpo celular. Con excepción de la prolongación larga, el axón, el resto de las neuritas son dendritas. La mayoría de las neuronas del encéfalo y de la médula espinal son de este tipo (Von Economo, 2007).

b) CÉLULAS GLIALES: la estructura de la glía del sistema nervioso central (CNS), así como la proporción de los tipos celulares, varía de unas zonas a otras. Estas células en general son más pequeñas que las neuronas y las superan en 5 a 10 veces en número (50% del volumen del encéfalo y la médula espinal). Las células gliales se dividen en base a su tamaño celular en dos grupos:

I. Macroglia: son células de mayor tamaño. Entre estas cabe destacar:

i. Oligodendrocitos: se trata de células con un número reducido de prolongaciones finas ramificadas solo en sus extremos (Figura 3 izquierda). La oligodendroglía se halla en la sustancia blanca y en la sustancia gris. La de la sustancia blanca, conocida como *oligodendroglía interfascicular*, es responsable de la formación de la vaina de mielina aislante alrededor de los axones del CNS, y las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (PNS) (Von Economo, 2007). En la sustancia gris, la *oligodendroglía satélite* se encuentra en contacto con los cuerpos celulares (Peters, 1975).

ii. Astrocitos: son células de sostén de la neuroglia que se caracterizan por tener morfología estrellada (Figura 3 derecha). Se encuentran en el cerebro y en la médula espinal (Nieuwenhuys, 2009).

Entre sus funciones cabe destacar la de sostén de las células endoteliales. Los astrocitos extienden sus prolongaciones hasta contactar con los vasos sanguíneos, formando así la barrera hematoencefálica (BBB). A causa de esta estrecha relación, se cree que los astrocitos desempeñan un papel esencial en el transporte de sustancias entre los capilares y las neuronas (Peters, 1975), mantenimiento el balance iónico extracelular. Participan activamente en el metabolismo neural y absorben neurotransmisores (glutamato y GABA) que

puedan encontrarse en exceso alrededor de las neuronas, protegiendo así las células nerviosas de recibir una estimulación desmedida (Schousboe and Redburn, 1995). Además, participan en el suministro de nutrientes al NS, como el glucógeno. Esta función es realmente importante debido a la incapacidad de almacenar moléculas energéticas por parte de las neuronas. Los astrocitos realizan la glucogenolisis al ser inducidos por la norepinefrina. Y por último, participan en la reparación y cicatrización de heridas traumáticas del NS y otras patologías (Lucas et al., 2006).

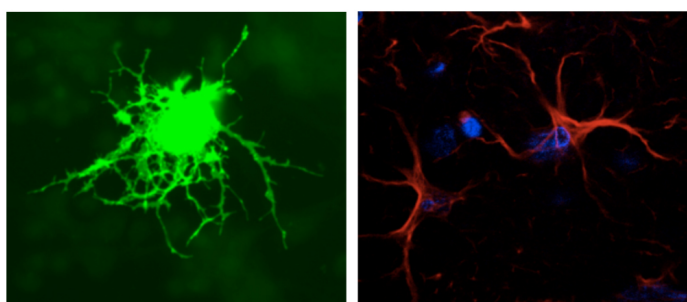


Figura 3. Imagen de una célula de oligodendroglia de la corteza cerebral de un ratón GFP (Broeke, 2005) (izquierda). Imagen de un astrocito de la corteza cerebral de una rata marcado con GFAP (derecha).

Ante circunstancias patológicas los astrocitos cambian su morfología, redondeándose y formando los llamados corpúsculos granulados, los cuales son capaces de almacenar lípidos y posteriormente digerirlos (Xia et al., 2010). Además, los astrocitos no sólo son capaces de proliferar sino que además aumentan la producción de gliofibrillas formando así las cicatrices gliales (Peters, 1975).

Cabe destacar que se han identificado dos tipos distintos de astrocitos. Los *astrocitos fibrosos* se encuentran fundamentalmente en la sustancia blanca, entre los axones mielinizados (Fitch et al., 1999). Emiten prolongaciones a conos axónicos de los nodos de Ranvier (Davis et al., 2002), confinando los neurotransmisores a la hendidura sináptica y eliminando los excesos (Squire et al., 2012). Por otro lado, los *astrocitos protoplasmáticos* se encuentran dispersos en la sustancia gris, constituyendo una gran parte de la misma. Unos establecen íntimas conexiones con los vasos sanguíneos y otros extienden sus prolongaciones hasta contactar con la piamadre encefálica y medular, formando la membrana pial-glial (Retzius, 1894, Davis et al., 2002).

II. Microglia: son células de menos tamaño celular que las descritas anteriormente (Figura 4). La microglía se encuentra en todas las regiones del CNS (Davis et al., 2002). Se caracteriza por poseer un cuerpo pequeño y alargado, de extraña forma. El citoplasma extiende largas prolongaciones que se ramifican a su vez, dándole a la célula un aspecto espinoso (Neumann et al., 2006, Nieuwenhuys, 2009, Ribak et al., 2009).

Entre las características de la microglía encontramos la capacidad para almacenar lípidos, hierro y pigmentos (Streit and Kincaid-Colton, 1995). La microglía puede cambiar su morfología, redondearse y transformarse en corpúsculos granulosos, capaces de fagocitar sustancias de desecho gracias a su movimiento ameboide (Graeber and Streit, 2010). Esta cualidad pone de manifiesto la participación de estas células en procesos inflamatorios y degenerativos. De aquí que se les pueda denominar células de arrastre o limpieza (Streit and Kincaid-Colton, 1995, Graeber and Streit, 2010).

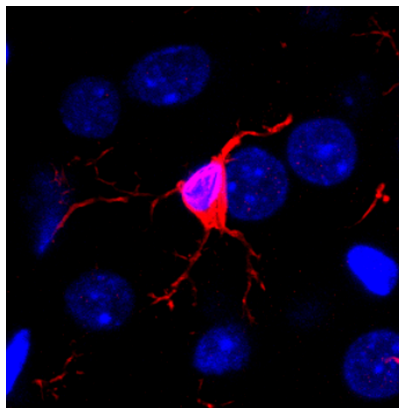


Figura 4. Imagen de un célula de microglia de la corteza cerebral marcada con el anticuerpo Iba1.

Gracias a la tinción de carbonato de plata, ya en los años 20, se observó que la microglía en el cerebro en desarrollo aparecía como cuerpos amorfos y a continuación se diferenciaba en formas ramificadas que establecían contactos con neuronas y astrocitos. También se pudo observar que ante una lesión o infección estos se asemejaban a macrófagos, ya que emigran a las zonas afectadas, proliferan y se hacen fagocíticos (Graeber and Streit, 2010). Más adelante se realizaron estudios sistemáticos con anticuerpos monoclonales que se unían a la microglía, pudiendo destacar las microglía como presentadora de antígenos, en concreto el complejo de histocompatibilidad clase II (Perry and Lund, 1989, Minghetti, 2005). También observaron que las células microgliales no se originan a partir de los tejidos embrionarios ectodérmico como el resto de células del

CNS, sino que se forma principalmente a partir del mesénquima y secundariamente a partir de las células de la cresta neural, penetrando en el sistema nervioso junto con los vasos sanguíneos (Kreutzberg, 1996). A medida que el SNC madura, esta microglía pasa a una forma ramificada y libera factores de crecimiento que favorecen la maduración y la supervivencia de la glía (Squire et al., 2012).

Tras un trauma, los astrocitos liberan factores neurotróficos que estimulan la activación de la microglía, iniciando mecanismos de reparación, promoviendo el crecimiento de nuevas neuritas (Wang et al., 2007). Las células que no se transforman inmediatamente en fagocíticas, pueden revertir al estado de reposo si la lesión es leve o reversible. Cuando el daño es grave y mueren neuronas, las células de la microglía comienzan a actuar como macrófagos fagocíticos. Sin embargo, la actividad de la microglía puede contribuir, paradójicamente, a la muerte de las neuronas y puede dar lugar a algunas enfermedades neurológicas (Aloisi, 2001, Ribak et al., 2009, Xia et al., 2010).

c) CÉLULAS EPENDIMARIAS: revisten las paredes de los ventrículos y el conducto central de la médula espinal. Forman una capa única de células cúbicas o cilíndricas que poseen microvellosidades y cilios (Doetsch et al., 1997) (figura 5). Las células endimarias regulan la neurogénesis en la SVZ (Chmielnicki et al., 2004; Lim et al., 2000). El movimiento de los cilios de las células endimales es necesario para el normal flujo del líquido cerebroespinal y la migración de los neuroblastos hacia el bulbo olfatorio (OB) (Sawamoto et al., 2006). En condiciones normales, las células endimales del cerebro son quiescentes; sin embargo, pueden adquirir características radiales de neuroglia y dar lugar a neuroblastos y astrocitos en respuesta a un accidente cerebrovascular (Zhang et al., 2007, Carlen et al., 2009).

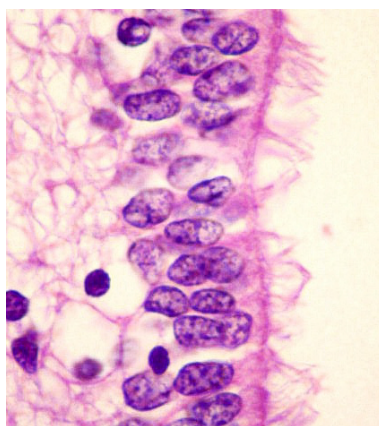


Figura 5. Imagen de una tinción de hematoxilina-eosina de las células endimarias con los cilios hacia el interior del ventrículo.

2. Lesiones cerebrales

Las lesiones cerebrales acarrear, como consecuencia, múltiples discapacidades (Unterberg et al., 2004) y son unas de las principales causas de muerte, especialmente entre los jóvenes (Prins and Hovda, 2003, Gaetz, 2004). A diferencia del resto de tejidos del organismo, una determinada lesión del CNS resulta prácticamente irreparable, ya que directa o indirectamente se activan un conjunto de mecanismos que dificultan y reducen la remodelación eficiente del sistema, conduciendo, en último lugar, a la pérdida de las facultades neurológicas del individuo (Gaetz, 2004, Sharp et al., 2011).

2.1. Lesión primaria y secundaria

La comprensión de la dinámica fisiopatología de la lesión cerebral es vital en el desarrollo de estrategias terapéuticas adecuadas. La lesión primaria es el resultado directo de la lesión inicial y puede ser difícil de tratar, pero conocer la compleja cadena de los cambios bioquímicos implicados en la lesión secundaria puede ayudarnos a encontrar diversas estrategias de tratamiento (Gaetz, 2004, Unterberg et al., 2004, Pitkänen and Macintosh, 2005). De este modo, se hace especial hincapié en el diseño racional de medicamentos dirigidos a la inflamación y la toxicidad del glutamato (Heo et al., 2005, Marklund et al., 2006, Schouten, 2007, Del Rio et al., 2011). Después de la lesión mecánica primaria, la lesión cerebral induce una respuesta multifactorial en el tejido, incluyendo la ruptura de la BBB y activación de las vías inflamatorias, lo que influye en la supervivencia neuronal y la recuperación funcional (Shlosberg et al., 2010). La neuroinflamación es una característica asociada con lesión cerebral traumática. En particular, los factores desencadenantes de TBI son la activación de astrocitos y microglía y la liberación de citoquinas proinflamatorias incluyendo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Ziebell and Morganti-Kossmann, 2010). Sin embargo, las consecuencias funcionales de la respuesta neuroinflamatoria permanecen en controversia. En modelos de ratón y de rata de lesión cerebral traumática (TBI), se ha podido observar que la liberación de citoquinas promueven lesiones en la BBB y empeoran el daño cerebral y, por tanto, funcional (Utagawa et al., 2008). Mientras que otros estudios sugieren que algunos aspectos de la inflamación pueden ser beneficiosos para el cerebro (Ziebell and Morganti-Kossmann, 2010, Ziebell et al., 2011).

En primer lugar, la respuesta general del cerebro a una lesión lleva consigo la interrupción de los vasos sanguíneos, provocando así una extravasación importante de sangre. Así mismo, se produce una infiltración y activación de las células que van a llevar a cabo la respuesta inflamatoria (Quintana et al., 2007). Además de la característica gliosis, tiene lugar la muerte neuronal y de células gliales causada por la hipoxia y producción de especies reactivas del oxígeno (Minghetti, 2005, Lucas et al., 2006, Xia et al., 2010). La activación de la compleja cascada de sucesos fisiológicos y bioquímicos tiene lugar durante las primeras horas e incluso días posteriores a la lesión (Gaetz, 2004, Xia et al., 2010).

En segundo lugar, las neuronas dañadas por la lesión son difícilmente remplazadas por nuevas neuronas, de tal modo que la muerte de grandes poblaciones neurales va irrevocablemente acompañada de la pérdida crónica de la función que desempeñan. Aunque se haya constatado la continua generación de neuronas en el CNS del individuo adulto (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002, Lledo et al., 2006, Kojima et al., 2010) los datos obtenidos hasta la fecha constatan que esta proliferación y diferenciación son insuficientes para reparar las zonas lesionadas sin que sean por sí sola una vía eficaz para el restablecimiento de la estructura y función neural (Kokaia and Lindvall, 2003, Whitney et al., 2009, Thau-Zuchman et al., 2010).

Por último, la lesión induce a las células gliales del CNS a entrar a un estadio de reactividad, donde no sólo van a intervenir los procesos de degeneración tisular sino que también van a participar activamente en el impedimento del crecimiento de los axones dañados. Los axones de las neuronas centrales, a diferencia de los axones del PNS, presentan una reducida capacidad de crecimiento. Situación que agrava el pobre soporte regenerativo aportado por las células gliales y que, en último término, impide la reconexión del circuito (Gennarelli, 1997, Zohar et al., 2003).

A pesar de que constituyen la mayoría de las lesiones de cabeza, los pacientes con traumatismos por contusión leve han estado poco representados en los ensayos clínicos, reduciendo la posibilidad de estudiar una administración adecuada de agentes farmacológicos (Jennings et al., 2008).

2.2. Modelo de criolesión

Se han desarrollado varios modelos experimentales de lesión cerebral traumática (TBI) en un intento por reproducir los diferentes aspectos de las alteraciones biomecánicas y déficits neurológicos observados en las lesiones cerebrales en el hombre. El modelo de percusión por fluido produce una lesión cerebral por la rápida inyección de fluido en la cavidad craneal cerrada (Hayes et al., 1983, Lyeth et al., 1988, Raslan et al., 2012). El trauma por impacto cortical controlado es inducido mediante el uso de un impactador neumático para lesionar el cerebro expuesto con una velocidad de impacto y deformación cortical medible y controlable (Dixon et al., 1991). En comparación con estos dos modelos de TBI focal, el modelo de lesión criogénica unilateral o criolesión, descrito por Klatzo por primera vez en 1958 (Klatzo et al., 1958) induce lesiones que son altamente reproducibles en cuanto a tamaño y ubicación.

El modelo criolesión (también llamado lesión fría) se sitúa en posición intermedia dentro de la jerarquía de los modelos de lesiones cerebrales (Klementiev et al., 2008), entre el modelo de craneotomía (Prins and Hovda, 2003, Williams et al., 2005) y el modelo de traumatismo craneal menor (Zohar et al., 2003, Henninger et al., 2005).

La criolesión cerebral es un modelo bien establecido que puede imitar algunas de las características de los TBIs en humanos (Cederberg and Siesjo, 2010, Sauerbeck et al., 2011) y el desarrollo de las consecuentes respuestas, como por ejemplo, el edema cerebral (Murakami et al.,

1999), la inflamación (Flentjar et al., 2002) y la disrupción de la barrera hematoencefálica (BBB) (Methia et al., 2001). Este modelo requiere una cirugía poco invasiva y mantiene el estado de asepsia, pero produce cambios severos en la morfología del cerebro, así como trastornos cognitivos y motores (Jones et al., 2005, Penkowa et al., 2006). Además permite por sí mismo el estudio de la angiogénesis y de los procesos de reparación en la corteza cerebral en un ambiente que no se ve afectado por la isquemia y por tanto, estos descubrimientos pueden ser relevantes para las lesiones traumáticas en la corteza cerebral humana (Nag, 1996, Raslan et al., 2012).

3. Estrés oxidativo y radicales libres

Se define el estrés oxidativo como una situación de desequilibrio entre los agentes oxidantes y los antioxidantes en favor de los primeros (Sies, 1991, Kaur and Ling, 2008). La vida aerobia se caracteriza por una formación constante de pro-oxidantes balanceada por la desaparición de los mismos debida a los antioxidantes (Circu and Aw, 2010).

Se denomina radicales libres a todas aquellas moléculas que contienen en su orbital más externo un electrón desapareado, por tanto, el electrón de dicho orbital necesitaría de otro para poseer una configuración bioquímica y electromagnética estable. Los radicales libres tienden a reaccionar con otras moléculas cercanas para completar este orbital incompleto, desestabilizando con ello la configuración electrónica de las moléculas con las que reaccionan, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas y pudiendo producir reacciones en cadena (Circu and Aw, 2010).

3.1. Papel fisiológico de los radicales libres

En cuanto al papel fisiológico, se ha demostrado la función de los radicales libres en la defensa antimicrobiana y antitumoral, también como mensajeros e inductores genéticos (Satriano et al., 1993, Zimmerman et al., 2002, Hardy and Hunt, 2004). Pueden intervenir en la inactivación o activación de ciertas enzimas (Fillebeen and Pantopoulos, 2002, Sindhu et al., 2005, Circu and Aw, 2010) y contribuir a la regulación de la extensión del proceso inflamatorio (Bourbon et al., 2004). Además, se ha postulado que el balance oxidante-antioxidante puede intervenir en el proceso de la apoptosis (Svensk et al., 2004, Circu and Aw, 2010).

Los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno proceden de fuentes metabólicas endógenas o de agresiones oxidativas externas. Dentro de las fuentes endógenas de producción de radicales libres podemos encontrar la cadena electrónica mitocondrial (Kas and Blattna, 1986, Gandhi and Abramov, 2012) la excesiva actividad de la NADPH fagocitaria (Gabig and Babior, 1979, Zhang et al., 2012) la activación del metabolismo del ácido araquidónico en procesos inflamatorios (Winyard et al., 1994), la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (Beckman et

al., 1990, Ninkovic et al., 2009) y/o la menor capacidad de los mecanismos protectores antioxidantes (Giugliano et al., 1996, Gandhi and Abramov, 2012).

Algunas de las fuentes exógenas de daño oxidativo son las radiaciones ionizantes (Fridovich, 1983, Datta et al., 2012) el aumento en la disponibilidad de metales de transición en algunas enfermedades metabólicas y en procesos inflamatorios (Halliwell and Gutteridge, 1986), la acción de xenobióticos y algunos fármacos (Trush et al., 1982) y el exceso en la concentración de oxígeno o los procesos en los que hay fenómenos de isquemia-reperfusión (McCord and Roy, 1982, Gandhi and Abramov, 2012).

Algunas técnicas como la medición de la capacidad oxidante mediante Elisa, nos dan cierta información sobre el estado de estrés oxidativo del tejido.

3.2. Los radicales libres en las lesiones cerebrales

Tras una lesión cerebral, la inflamación incontrolada incrementa el daño neuronal tras una lesión cerebral, ya que inicia una respuesta inflamatoria masiva y compleja, que contribuye a la liberación directa de mediadores neurotóxicos, la interrupción del flujo sanguíneo y la disfunción de la BBB con el posterior edema (Pitkänen and Macintosh, 2005, Xia et al., 2010). Tanto la etapa primaria como la secundaria producen una liberación de radicales libres que contribuyen a un aumento del estrés oxidativo y contribuyen a un incremento del daño neuronal (Gaetz, 2004) (Figura 6).

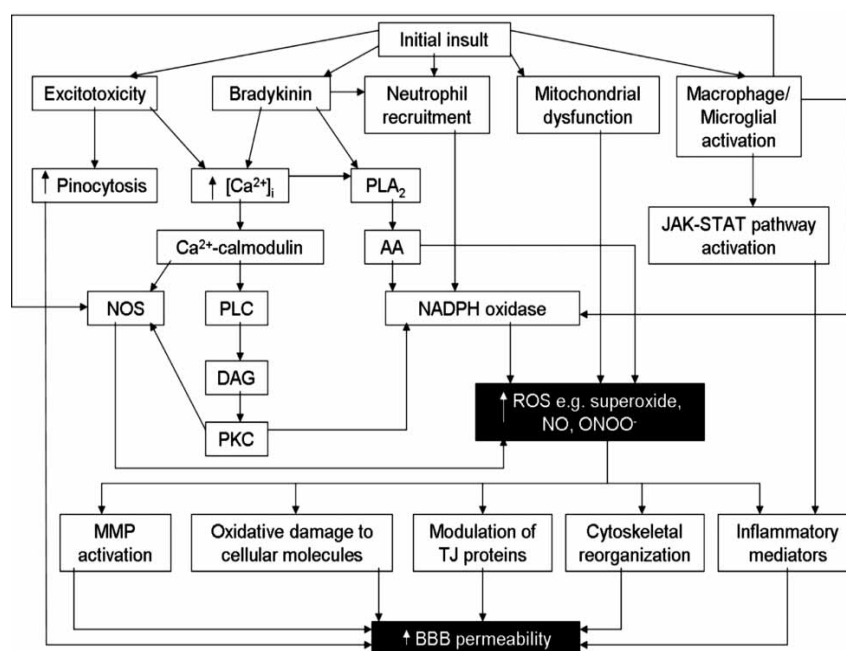


Figura 6. Esquema de los procesos metabólicos e inflamatorios y consecuencias de las lesiones cerebrales (Pun et al., 2009).

En particular, la agregación de los leucocitos y las plaquetas producen una alteración en la BBB y el edema cerebral contribuyen a la lesión secundaria (Lucas et al., 2006, Wang et al., 2007). La cascada de procesos inflamatorios en el tejido es similar a la observada en el daño por reperfusión isquémica. La pérdida de la integridad celular es consecuencia de los cambios iónicos en el edema citotóxico y contribuyen a daños en los vasos sanguíneos, en las células gliales y neuronas (Jennings et al., 2010).

La neurodegeneración está frecuentemente asociada al daño por radicales libres. Sin embargo, el aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS), el cual puede llevar en último término a la muerte celular. Los radicales libres generados a altas concentraciones bajo condiciones patofisiológicas no son detoxificados suficientemente (Jeong et al., 2012). Lo principal debe ser prevenir la salida de calcio para reducir la disipación de electrones mitocondriales (Circu and Aw, 2010, Gandhi and Abramov, 2012).

3.3. Radicales libres y barrera hematoencefálica

La BBB es una membrana protectora que restringe la entrada de moléculas y células blancas de la sangre de la circulación sistémica al CNS. Entre sus funciones esta la de mantener el balance homeostático del fluido extracelular cerebral (Pun et al., 2009, Li et al., 2012). La BBB esta formada por capilares membranosos, células endoteliales microvasculares (BMVECs), astrocitos y pericitos (Huppert et al., 2010).

Se sabe que estas ROS están aumentadas en las lesiones cerebrales y que contribuyen a un aumento de la permeabilidad de la BBB (Olesen, 1987, Liu et al., 2011). Además, las alteraciones en los niveles de antioxidantes y el daño oxidativo se han sido asociadas a la disfunción de la BBB (Pun et al., 2009) (figura 6). Por ejemplo, la disminución del glutatión reducido (GSH) en cerebro produce un aumento de permeabilidad de la BBB, mientras que la restauración de los niveles de GSH normales hace que se recupere la permeabilidad normal de la BBB (Agarwal and Shukla, 1999, Li et al., 2012). Debido a que el GSH es un importante antioxidante fisiológico, tales observaciones apoyan aún más la idea de que el estrés oxidativo es un factor determinante importante de la permeabilidad de la BBB (Li et al., 2012).

3.4. Defensa antioxidante

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, cuando está presente a concentraciones bajas en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell and Gutteridge, 1986, Circu and Aw, 2010). El término "sustrato oxidable" incluye casi todo lo que se encuentra en las células vivas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN. La desintoxicación de las especies reactivas del oxígeno es uno de los requisitos para la vida aerobia, por lo que se ha desarrollado un importante sistema defensivo antioxidante (Sies and de Groot, 1992).

3.4.1. El sistema glutatión

El glutatión es un tripéptido (constituido por ácido glutámico, cisteína y glicina) de interesantes propiedades biológicas debido a dos características estructurales: el enlace γ -glutamilo que lo protege de las peptidasas, y la presencia de un grupo tiol libre (-SH) que lo convierte en un compuesto muy reactivo con todo tipo de sustancias e incluso, consigo mismo (Meister and Anderson, 1983, Li et al., 2012). Es el tiol no proteico más abundante de prácticamente todas las células animales (Dringen, 2000) y su presencia se puede explicar en función de su protección frente a la toxicidad del oxígeno (Fahey et al., 1987, Wilkins et al., 2013).

Se considera estado del glutatión (GSH) al equilibrio entre las distintas formas en las que este tripéptido se puede presentar (Kosower and Kosower, 1978). Podemos encontrarlo en forma de tiol reducido (GSH), en forma oxidada (GSSG) y en forma de disulfuros mixtos, en su mayoría GS-S-proteína. Estas proteínas son responsables del mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas (Meister and Anderson, 1983, Wilkins et al., 2013) y se pueden detectar fácilmente por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Reed et al., 1980).

4. Antioxidantes

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas (Kaur and Ling, 2008). La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermedios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación, oxidándose ellos mismos. Debido a esto es que los antioxidantes son a menudo agentes reductores tales como tioles o polifenoles (Silva and Coutinho, 2010).

Hasta el 90% de las enfermedades degenerativas crónicas pueden estar causadas por radicales libres. Los antioxidantes ayudan a neutralizar estos radicales libres (Li et al., 2000, Kaur and Ling, 2008). No existe ningún antioxidante perfecto por sí mismo. Sin embargo, debido a sus características bioquímicas, el ácido lipoico se acerca bastante a este ideal (Packer et al., 1995, Sena et al., 2008). El uso de ácido lipoico ha sido ampliamente empleado, en la última década, como tratamiento a diversas enfermedades tales como la diabetes (Sena et al., 2008), Alzheimer (Siedlak et al., 2009) y en lesiones cerebrales (Toklu et al., 2009, Koga et al., 2012, Rocamonde et al., 2012).

4.1. El ácido lipoico como antioxidante

El ácido lipoico (LA), también conocido como ácido 1,2-ditiol-3-pentanoico o ácido tioico, es un compuesto organosulfurado derivado del ácido caprílico (Shay et al., 2009, Rochette et al.,

2013). Contiene dos átomos de azufre (en el carbono 6 y en el carbono 8) unidos mediante un puente disulfuro y, por tanto, está considerado como un oxidante (aunque el átomo de azufre puede existir en estados de oxidación altos) (Packer et al., 1995). El átomo de carbono 6 es quiral y la molécula existe como dos enantiómeros por separado: R-(+)-ácido lipoico (RLA) y S-(-)-ácido lipoico (SLA) (figura 7), y como una mezcla racémica de los dos enantiómeros: R/S-ácido lipoico. Sólo el enantiómero RLA existe en la naturaleza y es un cofactor esencial de cuatro complejos enzimáticos mitocondriales. El RLA y R/S-LA están disponibles en suplementos nutricionales y han sido utilizados nutricional y clínicamente para enfermedades y diversas condiciones (Shay et al., 2009, Rochette et al., 2013).

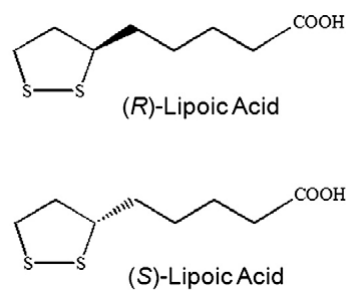


Figura 7. Estructura química de los enantiómeros R y S del ácido lipoico (Shay et al., 2009).

4.1.1. Propiedades del ácido lipoico

El LA es liposoluble e hidrosoluble, por lo que puede actuar en cualquier parte del organismo, es capaz de desarrollar su acción tanto dentro como fuera de las células (Packer et al., 1995, Shay et al., 2009). El ácido lipoico participa en el ciclo redox, elimina varios radicales libres y ROS. Además de ser un potente antioxidante, es capaz de mejorar la actividad de la mitocondria y es un posible estimulante de la síntesis proteica. La reactividad química del LA está principalmente conferida por su anillo ditiol. La forma oxidada (LA) y la forma reducida (DHHLA) crean un potente par redox que tiene un potencial de reducción estándar de -0,32 V. Esto hace el DHHLA uno de los más potentes antioxidantes de origen natural (Searls and Sanadi, 1960). De hecho, hay pruebas de que tanto el LA y DHHLA son capaz de eliminar una gran variedad de ROS. Tanto el LA como el DHHLA puede eliminar los radicales hidroxilo y el ácido hipocloroso (Searls and Sanadi, 1960, Buffo et al., 2010, Loov et al., 2012). El LA, y especialmente el DHHLA, tienen la capacidad de impedir la formación de proteínas carbonilo por la captación de residuos hipoclorito (Hernandez-Ontiveros et al., 2013). Además, DHHLA tiene la capacidad de regenerar otros antioxidantes endógenos (por ejemplo, vitaminas C y E) (Biewenga et al., 1997), tiene la propiedad de neutralizar los radicales libres sin convertirse en uno de ellos durante el proceso y de proteger

las membranas celulares mediante la interacción con la vitamina C y el glutatión (Packer et al., 1995, Shay et al., 2009).

4.1.2. Uso terapéutico del ácido lipoico en el sistema nervioso

Algunos antioxidantes como el α -tocoferol, son capaces de producir un efecto neuroprotector. Sin embargo, estos solo producen este efecto al ser administrados después de la lesión y no cuando son administrados anteriormente (Annahazi et al., 2007).

El LA, sin embargo, es un antioxidante usado tanto en la prevención como en el tratamiento de varios desordenes relacionados con el estrés oxidativo (Durrani et al., 2007). LA es tanto hidrofílico y lipofílico, lo que es una característica única entre los antioxidantes. Por esta razón, se la denomina "antioxidante de antioxidantes" (Emmez et al., 2010). Así mismo, la administración de ácido lipoico ha demostrado ser beneficiosa en numerosos modelos de estrés oxidativo tales como isquemia, diabetes, formación de cataratas, neurodegeneración y daño por radiaciones (Panigrahi et al., 1996, Clark et al., 2001, Sena et al., 2008, Freitas, 2009). Es bien conocido que el LA juega un papel crucial en la detoxificación de agentes neurotóxicos producidos por la inflamación (Flier et al., 2002, Khabbazi et al., 2012). Pero, no solo es protector del sistema nervioso, sino que además está relacionado con la regeneración nerviosa. Debido a que el LA atraviesa la BBB, tiene un efecto protector en el tejido nervioso y ha sido muy prometedor en el tratamiento de pacientes con derrames cerebrales, formación de trombos y otras alteraciones del cerebro relacionadas con el daño producido por los radicales libres (Packer et al., 1997, Lynch, 2001, Rocamonde et al., 2012). Además, el ácido lipoico ha sido recientemente estudiado en el tratamiento de lesiones cerebrales debido a su poder antioxidante y neuroprotector (Toklu et al., 2009, Rocamonde et al., 2012).

5. Capacidad regenerativa del sistema nervioso

Hasta la segunda mitad del siglo XX se pensaba que el cerebro adulto era incapaz de generar nuevas neuronas. Sin embargo, actualmente sabemos que tanto las neuronas como las células gliales se siguen produciendo por la diferenciación de células madre durante toda la vida de los seres vivos, en un proceso denominado neurogénesis (Kuhn et al., 1996, Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002).

La mayoría de las células del cerebro en un vertebrado son generadas durante el desarrollo embrionario a partir de células madre multipotenciales, situadas en una zona germinal alrededor del ectodermo durante las primeras etapas embrionarias, que persiste durante toda la vida de los individuos, aunque experimenta una reducción de volumen. Las capas celulares que rodean al ventrículo forman lo que se ha denominado zona ventricular (VZ) y constituyen un

epitelio pseudoestratificado de células radiales que proliferan continuamente, dando lugar a, prácticamente, todo el contingente de neuronas con el que vivimos tras el nacimiento (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002).

Hay regiones del sistema nervioso donde, en condiciones normales, existe neurogénesis, axonogénesis y dendritogénesis a lo largo de toda la vida del individuo (Ming and Song, 2005, Gonzalez-Perez et al., 2012). Es el caso, por ejemplo, del epitelio olfatorio, zona subependimal de los ventrículos laterales (LV), o la zona subgranular de la circunvolución dentada del hipocampo. Tras una agresión al sistema nervioso, bien sea traumática, isquémica, tumoral, etc, o tras una enfermedad degenerativa, se produce un daño en las neuronas que puede ser reversible o irreversible, dependiendo de si va acompañado de muerte celular (Thau-Zuchman et al., 2010).

Las neuronas dañadas responden de distinta forma dependiendo de si tienen que regenerar su axón en el PNS o en el CNS. Esta diferente capacidad regenerativa fue descrita por primera vez en mamíferos adultos, hace aproximadamente un siglo, por D. Santiago Ramón y Cajal, *“Histología del Sistema Nervioso del hombre y de los vertebrados”* (1899) y ha sido posteriormente estudiado en profundidad por diversos autores (Thau-Zuchman et al., 2010, Xia et al., 2010, Tamas et al., 2012).

Los axones dañados en el PNS son capaces de regenerar espontáneamente y, en el mejor de los casos, reconectarse con las estructuras diana. Esto se debe al entorno permisivo que crean las células de Schwann alrededor de los axones en crecimiento (Tamas et al., 2012). En comparación, los axones que sufren una agresión dentro del CNS son incapaces de crecer, quedando interrumpida permanentemente la vía nerviosa lesionada. Esto se debe a que las células de glía que rodean a los axones lesionados crean un entorno no permisivo para su regeneración. En el lugar de la lesión se forma una cicatriz glial, constituida por microglía y astrogía, que es fuente de moléculas inhibitoras (Whitney et al., 2009, Xia et al., 2010). El efecto final ocasionado por el conjunto de todas las moléculas que se producen en la zona de la lesión y fuera de ella, es la inhibición del proceso regenerativo. Esto conduce a una pérdida permanente e irreversible de las funciones mediadas por las neuronas dañadas (Zohar et al., 2003, Sharp et al., 2011).

5.1. Neurogénesis en el estado adulto

La neurogénesis es la producción de las células neurales del sistema CNS. Este, puede tener lugar durante el desarrollo, produciendo neuronas y otros tipos de células neurales que constituirán el tejido nervioso; y también puede darse en el estado adulto, que incluye la proliferación celular, supervivencia, migración y diferenciación de las células neurales una vez ha finalizado el desarrollo (Gould et al., 1999, Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002, Kojima et al., 2010).

La neurogénesis en el adulto fue descrita por primera vez en lagartos hace tan solo un siglo (Font et al., 2001). A partir de este descubrimiento se detectó en mamíferos y en el ser

humano. Además también se descubrió las células responsables de dicha neurogénesis (Alvarez-Buylla et al., 2002).

Hoy día se sabe que en todos los grupos de vertebrados, desde peces hasta mamíferos, incluyendo los humanos, se producen nuevas neuronas y células gliales después del nacimiento (Rakic, 2002, Arora et al., 2007, Noctor et al., 2008). Ello se debe a la existencia de células madre neurales o “neural stem cells” (NSC) que con muy pocas excepciones en vertebrados permanecen alrededor de los ventrículos laterales. Actualmente sabemos que, además, estas células pueden dar lugar en determinadas condiciones de cultivo a una mayor variedad de células (Lois and Alvarez-Buylla, 1993, Menn et al., 2006, Seri et al., 2006, Quinones-Hinojosa et al., 2007, Gonzalez-Perez et al., 2012).

Las NSC son aquellas células dotadas simultáneamente de la capacidad de autorrenovación (es decir, producir nuevas células madre) y de originar células hijas con capacidad para diferenciarse en todos los tipos de células nerviosas (Lledo et al., 2006, Gonzalez-Perez et al., 2012).

En humanos la generación de nuevas neuronas ha sido descrita en diferentes zonas del sistema nervioso: el bulbo olfatorio, el giro dentado del hipocampo, en la zona subventricular (SVZ) y en diferentes áreas de la corteza cerebral (Lledo et al., 2006). También se ha descrito esta neurogénesis en la región prefrontal, en la región temporal inferior, y en la región parietal posterior.

5.1.1. Neurogénesis en la zona subventricular

La SVZ es la zona germinal más extensa del cerebro y se encuentra a lo largo las paredes de los ventrículos (Doetsch et al., 1997, Gonzalez-Perez et al., 2012). En todos los mamíferos adultos, las nuevas neuronas nacen en la SVZ y migran al bulbo olfatorio (OB), donde maduran como interneuronas (Pencea et al., 2001, Rakic, 2002, Kojima et al., 2010). La SVZ presenta un importante reservorio de progenitores en el cerebro adulto, los cuales podrían emplearse para terapia celular (Figura 8).

Por otra parte, se ha podido observar que tras una lesión cerebral, las neuronas jóvenes, recién generadas aparecen en el área de infarto, donde la neurogénesis no se produce bajo condiciones normales (Lindvall and Kokaia, 2006, Kaneko and Sawamoto, 2009). Estudios recientes han implicado varias señales moleculares en la regulación de la migración de las NPCs en el cerebro lesionado, incluyendo factores angiogénicos y quimiocinas (Robin et al., 2006, Thored et al., 2006). Sin embargo, los mecanismos exactos de la migración de las NPCs en el cerebro lesionado no están claros (Kojima et al., 2010).

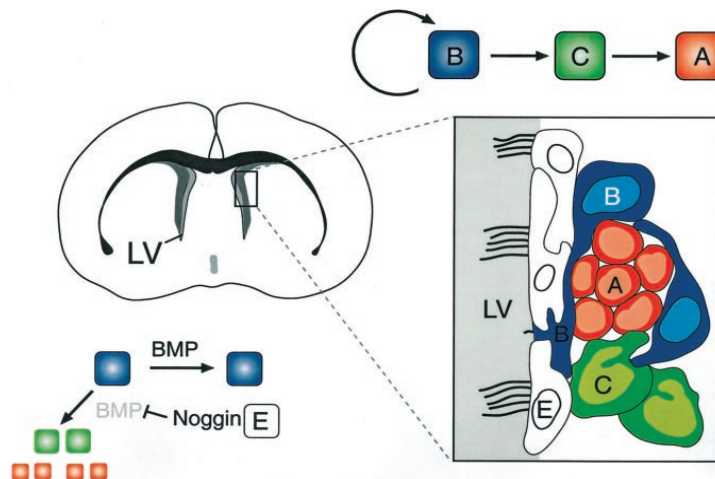


Figura 8. Organización y linaje en la SVZ. Sección transversal del cerebro de un roedor indicando la localización de la SVZ en la pared del LV (izquierda). Composición y organización celular de la SVZ (derecha) (Alvarez-Buylla et al., 2002)

5.2. Capacidad migratoria de las células madre neurales

Durante la formación del CNS y durante el estado adulto también se produce la migración de células desde los nichos neurogénicos hasta diversos puntos del cerebro (Alvarez-Buylla and Kirn, 1997). Miles de neuronas jóvenes migran al bulbo olfatorio todos los días (Lois and Alvarez-Buylla, 1994) pero sólo una fracción de estas células sobreviven para completar su diferenciación. Este proceso es aún más evidente en el hipocampo adulto (Barnea and Nottebohm, 1994, Kempermann et al., 1997, Gould et al., 1999) y los núcleos del canto de las aves adultas (Nottebohm, 1985, Alvarez-Buylla et al., 1990) dos sistemas en los que la generación de neuronas adultas ha sido ampliamente estudiado, se ha sugerido que estas nuevas neuronas están implicadas en la plasticidad y el aprendizaje (Alvarez-Buylla and Kirn, 1997, Bergstrom and Forsberg-Nilsson, 2012).

Dentro de los procesos de migración se pueden distinguir dos modalidades: la migración radial y la migración tangencial. La migración radial es el principal modo de migración que tienen durante el desarrollo del córtex cerebral (Hatten, 1999). Según este modelo las neuronas generadas en las zonas proliferativas se desplazan perpendicularmente hacia la superficie del cerebro a lo largo de un andamiaje de fibras gliales orientadas radialmente, cuyas prolongaciones abarcan todo el espesor del parénquima. A este tipo de migración también se le llama migración gliofílica, debido a la interacción entre las neuronas que migran y el sustrato glial (Nadarajah and Parnavelas, 2002). Otra modalidad la constituye la migración tangencial, ó neurofílica, según la cual las neuronas se mueven paralelamente a la superficie del cerebro a lo largo de los axones de otras neuronas y, a menudo, incluso traspasan las fronteras regionales. Este tipo de migración lo siguen fundamentalmente las interneuronas que son originadas en la eminencia ganglionar, situada en el telencéfalo ventral para alcanzar el córtex en desarrollo (Kojima et al., 2010).

Parece ser que la vasculatura está implicada en el nicho de células madre de diversos tejidos de mamíferos (Yoshida et al., 2007). En la SVZ adulta, células madre neurales y progenitoras pueden observarse en las proximidades de los vasos sanguíneos, formando un nicho vascular que mantiene la actividad proliferativa de estas células (Shen et al., 2008, Tavazoie et al., 2008). En el cerebro adulto del canario, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es producido por los vasos sanguíneos recién formados y entre sus funciones está la de mantener la neurogénesis (Kim et al., 2008). En el cerebro dañado de los mamíferos, incluyendo los humanos, las NPC aparecen próximos a los vasos sanguíneos cerca de la zona lesionada (Ohab et al., 2006, Thored et al., 2007). Anteriormente se ha podido observar que las cadenas de generación de NPCs están estrechamente asociadas con los vasos sanguíneos (Yamashita et al., 2006). En el cerebro lesionado de roedores, se ha observado que la angiogénesis promueve la supervivencia de las neuronas jóvenes y acelera la neurogénesis (Teng et al., 2008). Estos resultados sugieren fuertemente una estrecha relación entre el sistema vascular y la neurogénesis en el cerebro adulto. Sin embargo, el papel exacto de los vasos sanguíneos en la neurogénesis o la migración de NPCs después de la lesión cerebral siguen sin estar claros (Kojima et al., 2010).

6. Estrategias neuroregenerativas

La prevalencia de las lesiones del sistema nervioso y las consecuencias devastadoras para los pacientes que las sufren han instado la búsqueda de una estrategia experimental que permita a los axones lesionados crecer dentro del SNC. De esta forma, los resultados obtenidos en animales de laboratorio podrían ayudar a encontrar una terapia en personas.

En general, para que una estrategia reparadora del sistema nervioso sea eficaz debe de ser capaz de: estimular la entrada (a la zona lesionada) de las neuronas dañadas en "estado regenerativo"; promover el crecimiento de los axones a través de entornos adecuados (Schirmer et al., 2013); permitir que los axones puedan elongarse y ser guiados hacia dianas específicas; favorecer el restablecimiento de conexiones sinápticas con las dianas y en los casos que sea necesario, permitir la remielinización de los axones (Schmidt and Leach, 2003, Orive et al., 2009).

Aunque por el momento, las estrategias experimentales utilizadas no cumplen todos estos requisitos, todas ellas obedecen a una misma idea básica: favorecer la supervivencia de las neuronas lesionadas y proporcionar a los axones los factores y el entorno adecuado para que puedan crecer y ser funcionales. Con la mayoría de estas técnicas se ha conseguido incrementar la supervivencia de las neuronas lesionadas y que éstas crezcan su axón dentro de los múltiples entornos permisivos implantados. Así, en el campo de la ingeniería tisular se está produciendo un creciente interés por diseñar nuevos biomateriales compatibles con el sistema nervioso (Cao et al., 2013).

6.1. Utilización de biomateriales en estrategias regenerativas

El término biomaterial designa a aquellos materiales de origen no biológico utilizados en la fabricación de dispositivos que interactúan con sistemas biológicos y que se aplican en diversas ramas de la medicina (Tsapanos et al., 2002, Limova, 2003, Stavropoulos et al., 2003, Akncbay et al., 2007, Atzei et al., 2007, Ghanaati et al., 2013). En la actualidad, el uso de biomateriales con fines regenerativos está ampliamente extendido en el campo de la biomedicina. La aplicación de polímeros sintéticos y naturales ha sido ampliamente utilizada en casos como cura de heridas, sistemas de liberación de fármacos, injertos vasculares o reconstrucción de tejidos (Ito et al., 2005). Sin embargo, el diseño y evaluación de nuevos biomateriales destinados a estrategias neurorregenerativas es algo que requiere una especial atención dada la complejidad del sistema nervioso, ya que posee una capacidad regenerativa limitada en respuesta a las lesiones (Orive et al., 2009).

6.2. Propiedades relevantes de los biomateriales

Entre las propiedades de los materiales no puede faltar la de ser biocompatibles, o biológicamente aceptables. De este modo, en la evaluación de un material resulta fundamental estudiar determinados parámetros relacionados con su biocompatibilidad y su duración como biomaterial activo (Kang et al., 2005, Clapper et al., 2007), ya que estos materiales tienen que permanecer en contacto con los tejidos vivos, por lo que resulta imprescindible que no se produzcan reacciones no deseadas en la interfaz tejido-material (Menei et al., 2005, Kuijlen et al., 2006), y que mantengan sus prestaciones durante el tiempo que tengan que desempeñar su función (Livingston et al., 2002, Fujimoto et al., 2007, Yeo et al., 2008). Por tanto, conviene conjugar armoniosamente una serie de elementos como: las características químicas, físicas y la textura de la superficie del implante, su forma y diseño, así como también la solubilidad y alta reactividad de la superficie a implantar, la presencia de bacterias en el medio de implante, el pH, los fluidos intercelulares y los factores biomecánicos. En este sentido, los materiales destinados para implantes deben reunir una serie de propiedades biológicas, físicas, químicas y mecánicas específicas:

I. Propiedades biológicas: resulta de fundamental importancia que cualquier material implantado en el organismo no provoque reacciones adversas que impidan obtener el efecto deseado; es decir, el material debe ser biocompatible (Subramanian et al., 2009).

II. Propiedades físico-químicas: las propiedades físico-químicas más importantes de los polímeros son la cristalinidad, el comportamiento térmico, el comportamiento mecánico y la resistencia a la degradación química en general.

La cristalinidad de un polímero varía en función de cómo se encuentren las moléculas ordenadas en las tres dimensiones. Las cadenas de los polímeros son muy largas y fácilmente se enmarañan y a demás, en el estado fundido se mueven en un medio muy viscoso, así que no puede esperarse en ellos un orden tan perfecto, pero algunos polímeros exhiben ordenamiento parcial (Otsuka et al., 2013).

En el caso del comportamiento térmico hay que distinguir tres temperaturas, la de fusión, la de descomposición y la de transición vítrea.

III. Propiedades mecánicas: los materiales seleccionados para implantes deben poseer unas propiedades mecánicas adecuadas. Las propiedades más importantes para este fin son la rigidez, porosidad, interconectividad y tamaño de poros, superficie específica, permeabilidad y rugosidad del sustrato. Las características más relevantes de la superficie del implante son: rugosidad, grado de pulido, porosidad, potencial eléctrico, humectación y comportamiento hidrofóbico o hidrófilo, son factores decisivos que afectan su compatibilidad y determinarán la interacción del implante con las células adyacentes y su capacidad de colonizar su superficie (Yusong et al., 2013).

La rigidez del implante indica la mayor o menor deformación que experimenta ante la aplicación de cargas y se determina mediante el módulo de elasticidad (cociente entre la carga aplicada y la deformación que está produce dentro del rango de comportamiento elástico del material). En anteriores estudios se han comparado la eficiencia de materiales rígidos frente a otros con menor rigidez. Para estos estudios se utilizaron co-cultivos procedentes del ganglio basal y de la médula espinal, mostrándose una predisposición de las neuronas para crecer en los sustratos más flexibles, es decir, en aquellos menos rígidos (Georges and Janmey, 2005, Georges et al., 2006).

En el caso de los astrocitos, los resultados mostraron que este tipo celular, a diferencia con las neuronas, se adherían y se expandían óptimamente en los sustratos más rígidos. La rigidez mecánica puede afectar a la locomoción celular, a la morfología, a la adhesión, y a la expresión de proteínas del citoesqueleto (Georges et al., 2006, Sheridan et al., 2012). La tensión que la célula es capaz de generar depende de las propiedades inherentes de la matriz: una matriz relativamente rígida resistirá una fuerza celular mayor que una blanda, causando que la célula sea más rígida y se extienda sobre su periferia. No todos los tipos celulares parecen ser sensibles a la rigidez del sustrato, y no todos los tipos celulares mecano-sensitivos responden de forma similar a los cambios en la rigidez del sustrato (Sur et al., 2012).

Las propiedades estructurales que se estudian después del diseño y de la fabricación del un sustrato artificial, incluyen: porosidad, interconectividad y tamaño de poros, permeabilidad y rugosidad superficial. Estas características influyen tanto sobre las propiedades mecánicas del andamio como sobre su funcionalidad biológica.

i. Porosidad: una elevada porosidad y superficie específica son indispensables para una buena uniformidad del crecimiento de células así como para una adherencia

suficiente de los nuevos tejidos formados. Sin embargo, un sustrato con tal grado de porosidad posee una baja resistencia mecánica, por lo que se tiene que encontrar un compromiso entre difusión molecular y propiedades mecánicas del sustrato artificial para que sirva como “andamio”. Una alta porosidad facilita la acomodación de muchas células, así como poros interconectados facilitan la distribución uniforme de las células y la difusión de oxígeno y nutrientes (Ito et al., 2005).

ii. Permeabilidad del sustrato: este grado de hidrofilia/hidrofobia es una característica muy a tener en cuenta en la fabricación de los sustratos. Se determina por medidas del ángulo de contacto, a menudo se toma como parámetro indicativo de la humectabilidad o mojabilidad (*wettability*) de la superficie de un material, y correlaciona frecuentemente los fenómenos de interacción que ocurren con el medio biológico. Diversos estudios inciden sobre la influencia del sustrato en procesos biológicos como la proliferación celular. Igualmente, se han realizado estudios en co-polímeros con diverso grado de hidrofília, llegando a la conclusión que se produce una mayor adhesión celular en los co-polímeros cuya composición es más hidrofóbica (Mokry et al., 2000, Young and Hung, 2005, Soria et al., 2006, Soria et al., 2007). En este sentido diversos experimentos mostraron que la proliferación decrece de forma proporcional con el incremento de la hidrofobia de la superficie, excepto en aquellos polímeros derivados de los diácidos conteniendo oxígeno en su estructura los cuales eran buenos sustratos para el crecimiento si su superficie era muy hidrófoba (Brocchini et al., 1998).

iii. Rugosidad superficial: por otro lado, el acabado final y la textura de una superficie es de gran importancia e influencia para definir la capacidad de desgaste, resistencia a la fatiga y aspecto externo de un material, por lo que la rugosidad es un factor importante a tener en cuenta. Para evaluar las diferencias de rugosidad se emplean técnicas como la microscopia electrónica de barrido y la microscopia óptica interferométrica entre otras. Diversos estudios muestran el papel determinante de la rugosidad superficial del biomaterial en la adhesión, proliferación y diferenciación celular (Xu et al., 2004, Wan et al., 2005).

6.3. Aplicación de biomateriales en el Sistema Nervioso

En los últimos años, se han utilizado diferentes matrices biogénicas con el fin de crear un ambiente favorable para la regeneración del sistema nervioso. La fibronectina o matrices de colágeno han demostrado que favorecen los procesos de regeneración y reconstrucción del nervio periférico (Ejim et al., 1993, Brown et al., 1994, Keilhoff et al., 2003, Zhang et al., 2013).

Otra posibilidad para la regeneración del nervio ha sido el uso de biomateriales sintéticos que favorezcan el crecimiento axonal. Así, los filamentos de ácido poliglicólico combinado con laminina (LN) o colágeno y los materiales sintéticos basados en poli(glicerol sebacato) han sido probados como sustratos para apoyar el crecimiento axonal con la reducción de la formación de cicatrices (Mikos et al., 1993, Arai et al., 2000, Toba et al., 2001, Sundback et al., 2005). Sin

embargo, como ya se ha comentado con anterioridad, cuando se trata de establecer puentes que unan largas distancias (>10 mm) se han obtenido muy pocos resultados satisfactorios cuando se han utilizado para ello materiales biocompatibles (Hashimoto et al., 2002, Saracino et al., 2013).

No obstante, a pesar de una excelente respuesta *in vitro* por parte de diversos biomateriales en términos de supervivencia y diferenciación celular, es necesario el estudio *in vivo* relacionado con procesos de rechazo y gliosis en el CNS. En este sentido, en estudios realizados usando biomateriales biodegradables y acanalados, basados en poli(epsilon-caprolactona) (PCL) y poli(L-lactico-co-ácido glicólico) (PLGA), que fueron implantados en la corteza cerebral de ratas adultas, estudiándose la respuesta astrocitaria que producían en el tejido tras el implante (Danhier et al., 2012), se observó que aquellos biomateriales basados en el polímero PCL producían una menor respuesta inflamatoria que aquellos basados en PLGA, convirtiéndose en buenos candidatos para su uso *in vivo* (Chang et al., 2007, Wong et al., 2007). Otros estudios han destacado el uso de hidrogeles en lesiones cerebrales. Se implantaron hidrogeles de ácido hialurónico (HA) modificados con laminina y se observó que tras 12 semanas del implante, los hidrogeles de HA poseían propiedades mecánicas y comportamientos reológicos similares al tejido cerebral. Estos hidrogeles actuaron como un andamio, los cuales podían soportar infiltración celular y procesos angiogénicos, inhibiendo la cicatriz glial (Hou et al., 2005, Takeda et al., 2011).

Siguiendo un criterio basado en el estudio en paralelo *in vivo* e *in vitro*, materiales poliméricos formados por etil acrilato (EA) e hidroxietil acrilato (HEA) han sido estudiados recientemente con fines neuroregenerativos con resultados prometedores (Soria et al., 2006, Campillo-Fernandez et al., 2007, Veiga et al., 2011).

Por otra parte, recientemente se han estudiado una variedad de técnicas para conjugar factores de crecimiento u otras sustancias químicas, con los biomateriales naturales o sintéticos. Estos factores estarán disponibles para las células que entren en contacto con la matriz, proporcionando una señal muy localizada para controlar el destino de células (por ejemplo, la diferenciación de células madre (Dawson et al., 2008, Lee et al., 2011). Además, varios polímeros biodegradables tales como poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico), poli(butilcianoacrilato), quitosano (CS), y polilisina han sido explotados como sistemas de liberación controlada en el CNS (Gref et al., 2003, Xie et al., 2012). Estos biomateriales deben ser capaces de promover la regeneración nerviosa de una manera controlada y localizada. Actualmente, los tratamientos para TBI están enfocados en preservación del tejido sano restante después de la lesión en lugar de tratar de regenerar el tejido dañado. La sustitución de los tejidos dañados con *scaffolds* que contienen fármacos podrían ayudar a promover la regeneración y la recuperación funcional (Willerth y Sakiyama Elbert, 2007, Nitta y Numata, 2013).

Sin embargo, aun queda mucho que investigar sobre la capacidad de estos biomateriales para favorecer la regeneración y sus efectos sobre el sistema nervioso. En esta tesis se estudian algunos de los efectos de los materiales formados por co-polímeros de p(EA-co-HEA) 90/10, combinados a su vez con la administración de LA sobre la regeneración de la corteza cerebral tras un modelo experimental de lesión en rata.



HIPÓTESIS

Las lesiones cerebrales traumáticas son la principal causa de muerte y discapacidad en todo el mundo (Maegele and Schaefer, 2008, Shitaka et al., 2011). Después de una lesión cerebral, un gran número de células mueren, segregando productos neurotóxicos al medio extracelular, lo que incrementa las especies reactivas del oxígeno, este hecho afecta a la supervivencia celular y provoca un agrandamiento de la lesión inicial (Xia et al., 2010).

Aunque no existe ningún tratamiento verdaderamente efectivo, recientemente toman relevancia en investigación terapias neuroprotectoras y antioxidantes con el fin de evitar daños ulteriores tras un daño cerebral. En este sentido, el ácido lipoico es un potente antioxidante y neuroprotector usado como tratamiento de muchas enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple o la neuropatía diabética (Shay et al., 2009, Rochette et al., 2013).

Por otra parte, el uso de biomateriales con fines regenerativos está ampliamente extendido en el campo de la biomedicina. Sin embargo, el diseño y evaluación de nuevos biomateriales destinados a estrategias neurorregenerativas es algo muy novedoso y que requiere una especial atención dada la complejidad del sistema nervioso, y dado que posee una capacidad regenerativa limitada en respuesta a las lesiones (Orive et al., 2009, Schirmer et al., 2013).

Este trabajo propone el uso de forma combinada de un material polimérico biocompatible con el tejido nervioso para aportar un soporte físico en los procesos de regeneración tisular, con un tratamiento farmacológico basado en el empleo de ácido lipoico con el fin de mejorar las condiciones de supervivencia celular tras un daño cerebral.

Así pues, las hipótesis que se proponen en este trabajo son las siguientes:

El uso de ácido lipoico aplicado como tratamiento tras una lesión cerebral local es capaz de disminuir el estrés oxidativo y como consecuencia aumentar la capacidad de supervivencia celular tras la lesión, permitiendo la regeneración y reorganización del tejido nervioso.

El uso combinado de ácido lipoico y biomateriales poliméricos formados por etilacrilato-hidroxietilacrilato, proporcionan un soporte y un ambiente extracelular que facilita la regeneración del tejido nerviosos tras un daño cerebral.

OBJETIVOS

El principal objetivo de esta tesis doctoral es evaluar una estrategia neuroregenerativa basada en la combinación de un tratamiento farmacológico antioxidante con el uso de biomateriales poliméricos biocompatibles tras daño cerebral focal.

Por ello, esta tesis doctoral plantea los siguientes objetivos:

Evaluar la capacidad neuroregenerativa del tratamiento con ácido lipoico aplicado tras un modelo de lesión cerebral.

Objetivo 1: Evaluar el efecto antioxidante del ácido lipoico en el Sistema Nervioso Central.

Objetivo 2: Analizar la supervivencia celular y la diferenciación de células cerca de la zona lesionada en presencia de ácido lipoico.

Objetivo 3: Analizar la angiogénesis y gliogénesis en la zona lesionada en presencia del ácido lipoico.

Evaluar el tratamiento farmacológico con ácido lipoico combinado con el uso de un biomaterial polimérico en un modelo experimental de lesión cerebral.

Objetivo 4: Evaluar la biocompatibilidad del biomaterial con el tejido del Sistema Nervioso Central tras daño cerebral.

Objetivo 5: Analizar el proceso de colonización celular y determinar los tipos celulares presentes dentro del biomaterial en presencia y ausencia de tratamiento farmacológico con ácido lipoico.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Estabulación y manejo de los animales

Para este trabajo se utilizaron ratas macho de raza Wistar que procedían de una camada original de Harlan (Italia). Los animales utilizados tenían un peso al inicio del experimento de unos 250-300 g. Se dejaron aclimatar al menos una semana antes de iniciar los experimentos.

La estabulación se realizó en las instalaciones de la Unidad de Investigación del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU-Cardenal Herrera, donde se mantuvieron en jaulas en condiciones controladas de temperatura (20°C) y humedad (60%), bajo ciclos constantes de luz-oscuridad de 12 horas. Durante su estabulación tuvieron acceso a agua y a una dieta estándar para pequeños animales de laboratorio, fabricada y distribuida por Harlan (Italia).

La manipulación y cuidado de los animales se realizó siguiendo la Normativa del Real Decreto 1201/05 y los protocolos fueron previamente aprobados por la Comisión de Ética del Bienestar Animal de la Universidad CEU-Cardenal Herrera. Además, se tuvo la precaución de evitar cualquier estrés innecesario o infligir dolor a los mismos. El número de animales se reduce al mínimo necesario para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos. El sacrificio de los animales se lleva a cabo mediante la técnica más incruenta, rápida e indolora que, por otra parte, no influya en las variables consideradas en cada experimento.

2. Diseño experimental y metodología

En este trabajo se detalla el estudio de la aplicación combinada de un antioxidante, como es el ácido lipoico, y el implante de un biomaterial o *scaffold* tras un modelo de criolesión en la corteza cerebral.

En primer lugar, se llevó a cabo el estudio del efecto de la administración ácido lipoico tras el modelo de criolesión. Tras realizar la criolesión, se aplicó el tratamiento con ácido lipoico (LA) durante 7 días.

2.1. Modelo de criolesión

Para llevar a cabo la lesión en la corteza cerebral se realizó la técnica de criolesión adaptada del protocolo de Quintana *et al.* (Quintana et al., 2007). El animal se anestesió mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (12 mg/kg) (Imalgene, Leonvet, España) y acepromicina (0.4 mg/kg) (Calmo Neosan, Pfizer, España). El animal se colocó en posición de decúbito prono en el estereotáxico (Leica) utilizando soportes intraauriculares y para el maxilar superior con el fin de mantener el cráneo sujeto.

Se rasuró con máquina eléctrica la zona a intervenir, pincelando toda el área con una solución al 10% de polividona yodada. A continuación se realizó una incisión longitudinal en la línea media de la cabeza, se separó la piel, exponiéndose así el cráneo y con ayuda del bisturí se fue limpiando toda esta zona hasta observar el punto de referencia Bregma.

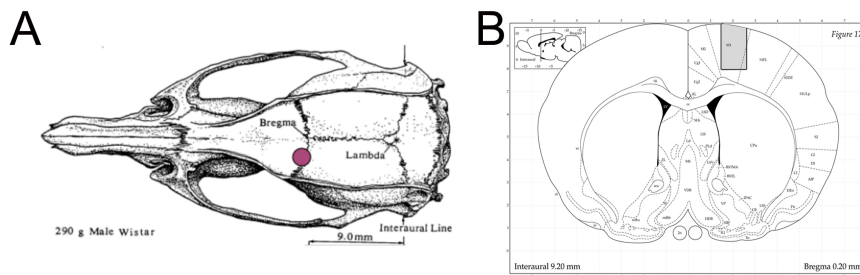


Figura 10. Imagen superior del cráneo de una rata (A), el punto rojo indica donde se realizó la trepanación y la posterior criolesión. Lámina de un corte coronal a la altura de bregma indicando las posición y extensión de la lesión realizada (B). (Paxinos and Watson, 1986).

Tomando Bregma como punto de referencia (0,0) y con la ayuda de un taladro quirúrgico se realizó una craneotomía de 2 mm de diámetro (Figura 10.A), profundizando hasta alcanzar la duramadre pero sin llegar a perforarla, en el punto (0, 1.5 mm) siguiendo las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson, 1986). A continuación se empleó un estilete de acero inoxidable (1 mm \varnothing), previamente sumergido en nitrógeno líquido (-196 °C), que se insertó hasta una profundidad de 1 mm y se mantuvo durante 20 seg, con el objetivo de lesionar la corteza cerebral (Figura 10.B). Al acabar el procedimiento se suturó la piel y se le administró buprenorfina (0,015 mg/kg) y metamizol (20 mg/kg) en el postoperatorio.

2.2. Administración de ácido lipoico

El tratamiento aplicado es una solución de ácido α -lipoico (LA) (Sigma Aldrich, España) disuelta en suero fisiológico (NaCl 0.9%) pH 7.4. Este se administra por vía intraperitoneal una vez al día, durante 7 días consecutivos, comenzando el mismo día de la operación. Al otro grupo experimental se le administra el mismo volumen de una solución de suero fisiológico.

Además, con el objetivo de realizar un estudio sobre la proliferación celular se procedió a la administración de bromodesoxiuridina.

2.3. Administración de bromodesoxiruridina (BrdU)

La 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) es un nucleótido sintético análogo de la timidina. La técnica de BrdU es comúnmente empleada para la detección de células en división en tejidos vivos ya que el BrdU puede incorporarse a la nueva síntesis de DNA durante la fase S del ciclo celular, sustituyendo a la timidina durante la replicación del DNA.

Para el estudio de la proliferación celular, a los animales se les administró por vía intraperitoneal, una dosis diaria (100 mg/kg) de una solución de BrdU (Sigma Aldrich, España) disuelto en tampón Tris 0.1M pH 7.4, los dos primeros días tras la operación.

Los animales fueron sacrificados a los 7 días para el estudio de la capacidad antioxidante y el GSH, y a los 15 días para determinaciones inmunohistoquímicas, western blot y microscopía electrónica (Figura 11).

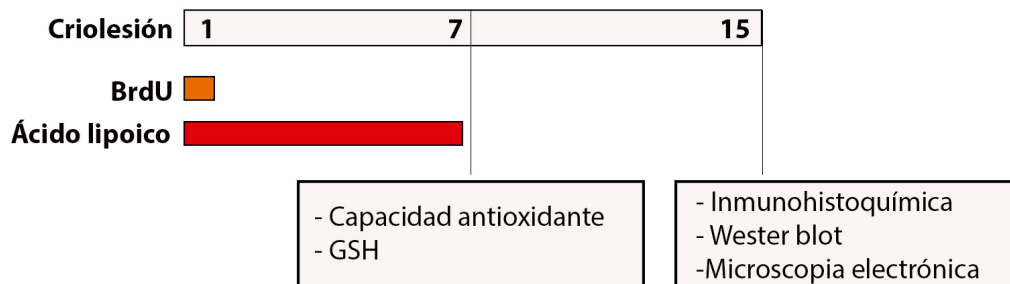


Figura 11. Esquema del diseño experimental y los procedimientos realizados en el estudio del efecto del ácido lipoico tras el modelo de criolesión.

2.4. Estudio de la capacidad angiogénica del ácido lipoico

Para el estudio de la capacidad angiogénica del LA se realizó el procedimiento descrito anteriormente (ver apartados 2.1 y 2.2.). A los animales se les administró una dosis i.p. de bevacizumab (10 mg/kg) (Avastin®, Roche, España), un agente bloqueante de VEGF (Kobold et al., 2009) justo antes de la operación de la operación. Los animales fueron sacrificados a los 15 días y se llevaron a cabo western blot de las proteínas VEGF y Colágeno IV (Figura 12).

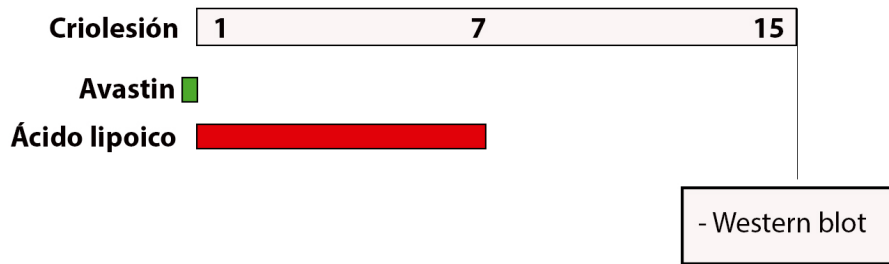


Figura 12. Esquema del diseño experimental y los procedimientos realizados en el estudio de la capacidad angiogénica del ácido lipoico.

En segundo lugar, se realizó el estudio de la combinación del tratamiento con ácido lipoico y el implante del biomaterial.

2.5. Implante del biomaterial

Se realizó el procedimiento descrito anteriormente con el fin de llevar a cabo la criolesión, pero esta vez la lesión se llevó a una profundidad de 4 mm. (Figura 13.A y 13.B).

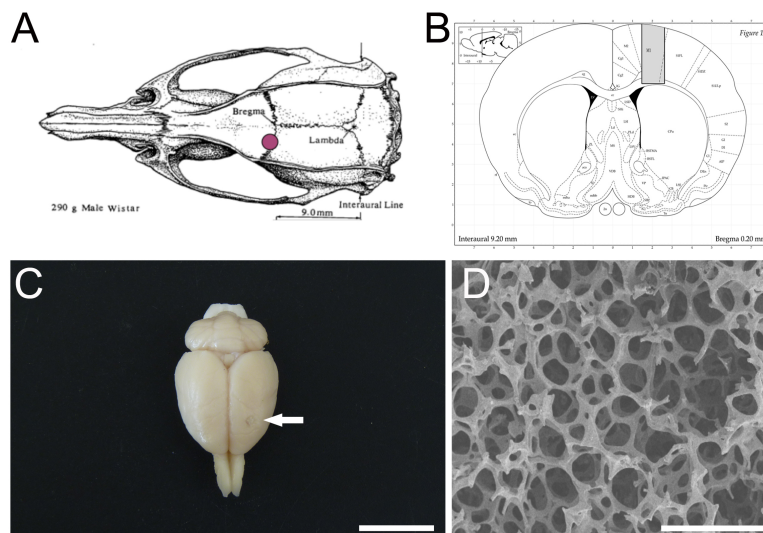


Figura 13. Dibujo de un cráneo de rata en vista dorsal indicando donde se realiza el trépano (A). Dibujo del lugar de realización de la lesión e implante del biomaterial dentro de la corteza cerebral (B). Fotografía de un cerebro fijado al que se le ha implantado el biomaterial (C). Aspecto del biomaterial implantado, imagen tomada por microscopia electrónica de barrido(D). Barras de escala: 10 mm en C y 200 μ m en D.

Los biomateriales empleados eran co-polimeros acanalados de poli-etilacrilato-hidroxietilacrilato (p(EA-co-HEA)) en una proporción 90/10 facilitados por el Centro de Biomateriales de la Universidad Politécnica de Valencia. Antes del implante, los biomateriales fueron lavados con suero fisiológico y esterilizados bajo luz UV durante 20 min. El implante del biomaterial (1 x 4 x 1 mm) con la ayuda de unas pinzas de microcirugía en la zona lesionada de la corteza cerebral (Figura 13.C y 13.D). Una vez acabado el procedimiento los animales fueron suturados. De igual modo que en el estudio anterior, el LA fue administrado durante 7 días (ver apartado de *Material y Métodos* 2.2.). Se sacrificaron los animales a los 15 y 60 días para determinaciones inmunohistoquímicas, y a los 60 y 180 días se realizaron resonancias magnéticas (Figura 14).

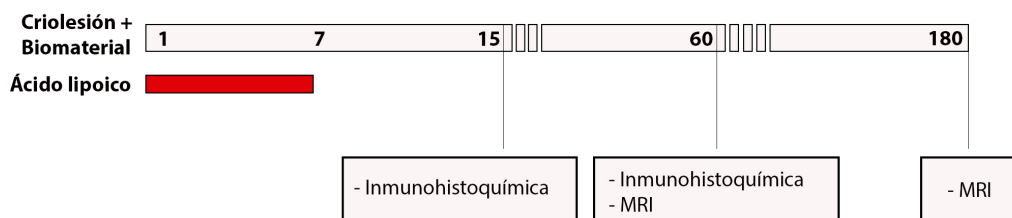


Figura 14. Esquema del diseño experimental y los procedimientos realizados en el estudio de la combinación de biomateriales y ácido lipoico.

3. Obtención y procesado de muestras

3.1. Obtención de muestras para determinaciones bioquímicas

Para la obtención de las muestras para determinaciones bioquímicas, los animales fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol, España), se extrajo el cerebro y se realizó la disección de la zona lesionada con la ayuda de un sacabocados (2 mm de diámetro interno). Este material se conservó a -80°C hasta su utilización.

3.2. Obtención de muestras para inmunohistoquímicas

3.2.1. Perfusión con paraformaldehído al 4%

Cuando el animal muere es necesario preservar los tejidos para evitar procesos de autólisis debido a sus propias enzimas y conservar los tejidos. Para ello se emplea una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en suero fisiológico salino (NaCl 0.9%) pH 7.5.

Los animales fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital sódico. Antes de comenzar la perfusión se lavó la bomba de perfusión (Minipus 3 Gilson) con salino y se purgó para eliminar las burbujas. A continuación se colocó el animal de cúbito supino en un bloque y se inmovilizó. Se realizó un corte sobre el esternón de 8 cm, lo suficiente para exponer el final del esternón. Se pinzó el mismo, se cortó el diafragma y se realizaron ambos cortes laterales en las costillas. A continuación se introdujo una cánula dentro del corazón, entrando por el ventrículo izquierdo. Con unas tijeras pequeñas se realizó una incisión en la aurícula derecha para evitar el exceso de presión en el corazón y facilitar la circulación de retorno. Entonces, se encendió la bomba y se lavó el sistema con salino durante 10 min. Finalmente, se colocó la solución fijadora de PFA 4% y se mantuvo durante 15 min.

Una vez perfundido el animal, se extrajo el cerebro completo sin diseccionarlo. Las muestras se colocaron durante 12 h en la misma solución fijadora de PFA 4% a 4°C. Posteriormente, se cambiaron a una solución de sacarosa 30% entre 24-48 h a 4°C y se incluyeron en OCT para poder ser cortadas a 20 μm en el criostato (Leica). Los cortes fueron guardados a -80°C hasta su utilización.

3.3. Obtención de muestras para microscopía electrónica

Parte de los animales de los grupos CR (n=4) y CR+LA (n=4) fueron perfundidos con 100 mL de una solución de NaCl 0.9% y 200 mL de paraformaldehído 2% + glutaraldehído 2.5% para el estudio de microscopía electrónica. Una vez perfundidos los cerebros fueron extraídos y post-fijados a 4°C con la misma solución de fijación durante 2 h. Los cerebros fueron entonces cortados con vibratomo (200 μm) y las rodajas resultante fueron teñidas con fosfatasa alcalina. Las rodajas fueron introducidas en PBS durante toda la noche y colocadas a 4°C para el lavado. Fueron fijadas con tetraóxido de osmio 1% y glucosa 7% durante 1 h a temperatura ambiente, lavadas 3 veces con ácido málico e incubadas con acetato de uranilo durante 1 h (2% en ácido málico). Las secciones fueron lavadas con ácido málico y deshidratadas con soluciones crecientes de alcoholes (30°, 60°, 90°, 100°). Se lavaron durante 2 min en óxido de propileno y se embebieron en Durcupan™ (Fulka, España). A partir de este momento el procesamiento de la muestra se llevó a cabo según Doetsch *et al.* (Doetsch F, 1997).

4. Procedimientos y técnicas

4.1. Tinción de hematoxilina-eosina

Para el estudio histológico macro y microscópico se realizó la tinción hematoxilina-eosina. Para ello se hidrataron las muestras con alcoholes de gradaciones decrecientes, se sumergieron en agua y se incubaron en hematoxilina de Harris (Sigma Aldrich, España) durante 5 min. Después se pasaron 5 seg por etanol clorhídrico y se lavaron con agua. A continuación se

incubaron en eosina al 2% durante 2 min, se deshidrataron y se fijó el cubreobjetos con medio de montaje Eukitt® (Sigma Aldrich, España).

4.2. Determinaciones bioquímicas

Las muestras se homogenizaron introduciéndolas en un homogenizador de vidrio, que contenía 300 µL de tampón fosfato potásico 0.1 M pH 7.0 a una temperatura de 4°C. A continuación se centrifugaron a 6000 rpm durante 2 min a 4°C y se recogió el sobrenadante.

Inmediatamente después, se acidificaron 180 µL del homogenado con 20 µL de ácido perclórico (PCA) al 20%. Se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min a 4°C, se recogió el sobrenadante que se conservó a -20°C para la determinación de la concentración de glutatión por HPLC. El resto del homogenado sin acidificar se centrifugó a 6000 rpm durante 2 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante e igualmente se conservó a -20°C para la determinación de proteínas.

4.2.1. Determinación de proteínas (Método de Lowry)

Se realizó según el procedimiento descrito por Lowry et al. (Lowry et al., 1951), con las modificaciones utilizadas habitualmente en nuestro laboratorio, y que a continuación se detallan.

i. Solución A: Na₂CO₃ 4%, NaOH 0.8% (se disolvieron 40 g de carbonato sódico y 8 g de hidróxido sódico en 1 litro de agua bidestilada).

ii. Solución B: CuSO₄ 1.25 mM, C₄H₄KNaO₆ 1.42 mM. (se disolvieron 200 mg de sulfato de cobre y 400 mg de tartrato sódico potásico en 1 L de agua bidestilada).

Las soluciones A y B se conservaron a 4°C hasta su utilización.

iii. Solución C: Reactivo de Folin-Ciocalteu 1N (Fluka Analytical, Sigma Aldrich, España) en dilución 1:2 en agua bidestilada.

iv. Solución D: Solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) 1 mg/mL (Sigma Aldrich, España).

La solución D se conserva a -20°C hasta su utilización.

Se prepararon tubos de ensayo de la curva patrón con cantidades diferentes de la solución D (0, 10, 25, 50, 75 y 100 µL) y se añadió agua bidestilada hasta un volumen de 200 mL. Los tubos de ensayo donde se añadieron las muestras contenían 15 mL de muestra y 185 mL de agua bidestilada. Tanto la curva patrón como las muestras se hicieron por duplicado. Se mezclaron las soluciones A y B a partes iguales y a cada tubo de ensayo se le añadió 1 mL de esta mezcla. Se dejó reaccionar durante 10 min a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron 100 µL de la solución C (reactivo de Folin) a cada uno de los tubos. Se agitó bien y se esperó durante 25 ó 30 min. Pasado este tiempo se midió la absorbancia de cada uno de los tubos de ensayo en espectrofotómetro (Genesys) a una longitud de onda de 696 nm. La absorbancia a 696 nm es directamente proporcional a la concentración de proteínas. Con los valores de absorbancia

de los distintos estándares obtenemos la recta patrón y por extrapolación obtenemos las concentraciones de proteínas de las muestras analizadas.

4.2.2. Determinación de glutatión

La concentración de GSH en las distintas muestras se determinó por el procedimiento descrito por Reed (Reed et al, 1984). El método se basa en la reacción del ácido iodoacético con los grupos tioles para formar derivados carboximetilos seguido de una derivatización cromófora de los grupos amino con el reactivo de Sanger (1-fluoro-2,4-dinitrobenceno) dando lugar a derivados N-DNP. Estos derivados son rápidamente separados por HPLC lo que permite la cuantificación de niveles nanomolares de GSH, GSSG y aminoácidos relacionados.

Trabajamos con un equipo de HPLC de la marca Gilson que constaba de los siguientes componentes:

- ♦ Bombas cromatográficas: Gilson 322 Pump.
- ♦ Detector: Gilson 156 UV/VIS.
- ♦ Lámpara UV y visible.
- ♦ Desgasificador Gilson 864
- ♦ Autoinyector 234 Gilson con loop de 100 µL.
- ♦ Gilson serial Input /Output Chanel (GSIOC).
- ♦ Ordenador 486/50 Hz.
- ♦ Software: Unipoint™ System.

La columna cromatográfica de separación empleada fue una Kromasil Amino 5 µm, de 250 x 4,6 mm (Análisis Vínicos, España). Las condiciones iniciales del flujo fueron de 1 mL/min, 80% de la fase móvil A y 20% de la fase móvil B. Estas condiciones iniciales fueron mantenidas durante 10 min seguidas de un gradiente lineal hasta el 95% de la fase móvil B durante 40 min y reequilibrado con las condiciones iniciales durante 10 min antes del análisis de la siguiente muestra. La longitud de onda utilizada fue de 365 nm. El rango del detector ultravioleta empleado fue 0.005 y el tiempo de respuesta de 5 seg. La inyección de cada muestra se realizó automáticamente con un autoinyector con capacidad para 45 muestras.

La fase móvil A se preparó con metanol al 80% en agua de calidad HPLC y la fase móvil B se preparó con acetato sódico 5 M en metanol al 80%. Posteriormente se filtraron a través de un filtro-membrana (Scheicher und Schuell) de 0.45 µm de poro y 47 mm de diámetro. La solución madre de calibración se preparó diariamente y se conservó en nevera a 4°C. Dicha solución madre consistió en una concentración 10 mM de glutatión reducido en agua ultrapura.

La solución 1 es una preparación de ácido iodoacético (100 mM) y m-cresol 0.2 mM. La solución 2 es una preparación de DNFB (1-fluoro-2,4-dinitrobenceno) 1.5% v/v en etanol puro. Se preparó fresco cada día y se conservó a 4°C protegido de la luz.

En tubos eppendorf de 2 mL se pipetearon 0,09 mL de la muestra y 0.018 mL de ácido iodoacético 100 mM en 0.2 mM de m-cresol. Cada solución se ajusta a un pH de 8,5-9 por adición de KHCO_3 3 M en KOH 10 M. Incubamos durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad antes de la adición de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzina para formar los derivados N-DNP. Éstos requieren un mínimo de 4 h en oscuridad a 4°C para su formación. Posteriormente se centrifugaron 10 min a 13000 rpm y el sobrenadante se utilizó para el análisis en el equipo de HPLC. La cantidad de muestra mínima inyectada fue de 115 μL para tener la seguridad de llenar el *loop* de 100 μL .

En cada análisis se preparó un blanco y una curva de calibración de estándares (0; 20; 40; 50; 60; 80 y 100 μM). El área del pico obtenido es directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra, que se calcula por extrapolación en la recta de regresión obtenida con los estándares. Los valores obtenidos fueron referidos a la concentración de proteínas de la muestra.

4.2.3. Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante total se midió mediante un kit comercial de ELISA Antioxidant Assay Kit (Cayman Chemical Company,, USA). El método se basó en la habilidad de los antioxidantes de la muestra para inhibir la oxidación de ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) a ABTS^+ por la metmioglobina. La cantidad de ABTS^+ producido puede ser estimado leyendo la absorbancia a 750 nm o 405 nm. Bajo las condiciones de la reacción realizada, los antioxidantes de la muestra causan una supresión de la absorbancia a 740 nm o 405 nm proporcional a su concentración. De este modo, la capacidad de los antioxidantes de la muestra para prevenir la oxidación de ABTS fue realizada por comparación con el Trolox, un tocoferol hidrosoluble análogo, y fue cuantificada en milimolar equivalentes de Trolox.

En primer lugar, se reconstituyeron los componentes del kit. Diluimos 3 mL de la solución buffer 10X (5 mM fosfato potásico pH 7.4, 0.9% cloruro de sodio y glucosa 0.1%) con 27 mL de agua bidestilada. Reconstituimos el cromógeno ABTS con 6 mL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ y aplicamos vortex. A continuación añadimos 600 μL de la solución buffer 1X al vial de la metmioglobina. Se adicionó 1 mL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ al vial del Trolox. Este fue empleado para realizar la curva patrón. Una vez diluidos 10 μL de peróxido de hidrógeno 8.82 M con 990 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$, se pipetearon 20 μL y se diluyeron en 3'98 mL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ para conseguir una solución de trabajo de 441 μM .

Se prepararon los patrones de Trolox (P_0 , P_{30} , P_{60} , P_{90} , P_{120} , P_{150} , P_{220}) diluyéndolo en la solución buffer 1X.

A continuación se adicionaron 10 μL de metmioglobina, 150 μL de cromógeno y 10 μL de los patrones y de las muestras correspondientes. Por último añadimos 40 μL de H_2O_2 e incubamos en oscuridad y agitación durante 5 minutos. Inmediatamente después, se midió la absorbancia en un lector de placas (VICTOR Perkin Elmer 2030) a 405 nm. Los valores obtenidos ($[\text{ABTS}^+]$) fueron referidos a la concentración de proteínas de la muestra.

4.2.4. Electroforesis y Western blotting

La electroforesis incluye las técnicas de separación que implican la separación en un campo eléctrico de partículas cargadas. En el caso de la electroforesis de proteínas, el proceso se diferencia en función de los electrodos, el tampón de electroforesis y el soporte que utiliza.

La metodología de western blot empleada está descrita en "Current Protocols in Protein Science" (Coligan, 2003). Este procedimiento consiste en la separación de proteínas por electroforesis por el sistema SDS-PAGE en geles de acrilamida y su posterior transferencia cuantitativa e irreversible a una membrana de PVDF. La presencia de proteínas estudiadas en las muestras fueron obtenidas a partir de la lisis del tejido extraído de la corteza cerebral y se puso de manifiesto por medio de los anticuerpos específicos (De la Fuente González et al., 2007).

i. Aislamiento de las proteínas: los tejidos extraídos de los animales se homogenizaron en un tampón de lisis (150 mM NaCl, 1% Tritón, 1mM DTT, 50 mM Tris pH 8.0) más un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche, Mannheim, Germany) y de fosfatasas (10 mM NaF, 1mM Na₃VO₄) y se incubaron durante 30 min en hielo. Tras la centrifugación de los lisados (20.800 g, 20 min en una centrifuga refrigerada) (Eppendorf 5417 R, Barkhausenweg, Germany) se recogió el sobrenadante para su posterior cuantificación.

ii. Cuantificación de la proteínas: la cuantificación de las proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando el kit de detección Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La absorbancia de la reacción colorimétrica se midió a 595 nm en un espectrofotómetro modelo Spectronic® 20 Genesys™.

iii. Migración electroforética en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó en cubetas Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) en geles del 11-15% de poliacrilamida, cargando 50 µg de proteína total. Antes de realizar la carga, se añadió a las muestras tampón de carga 5X (15% SDS; 50% glicerol; 0.1% azul de bromofenol; 312.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 16% β-mercapto-etanol) y se calentaron a 95°C durante 5 min.

Para separación por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida, se utilizó un sistema MiniProtean III (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y un tampón compuesto por 50 mM Tris, 27 mM glicina y 0.1% SDS. La electroforesis se realizó a 200V durante 60 minutos.

Como patrón para identificar el peso molecular de las proteínas se utilizó el marcador Bench/Mark™ Prestained Protein Ladder (Invitrogen, Paisley, UK).

iv. Transferencia: la transferencia se hizo a una membrana de PVDF (Immobilon™-P Transfer Membrane, Millipore, Billerica, MA, USA) durante 1 hora a 100V en un aparato MiniProtean (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y con un tampón compuesto por 20% metanol, 20 mM Tris y 150 mM glicina.

Transcurrido ese tiempo, las membranas se tiñeron en una solución de rojo Ponceau S (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 0.1% en 1% ácido acético para comprobar la eficiencia de la transferencia. Seguidamente, las membranas se lavaron con tampón tris salino (TBS, 20 mM

Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) y se incubaron en solución de bloqueo (5% de leche descremada en polvo en TBS + 0.1% Tween-20, TBT) durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

Tabla 1. Listado de anticuerpos primarios y secundarios para western blot.

| Anticuerpo 1° | Casa comercial | N° catálogo | Dilución | Descripción |
|---------------------------------|------------------|-------------|----------|----------------------|
| Anti-VEGF (A-20) | Santa Cruz | sc-152 | 1:1000 | Policlonal de conejo |
| BDNF | Santa Cruz | Sc-548 | 1:1000 | Policlonal de conejo |
| pCREB-1 | Santa Cruz | sc-7978 | 1:200 | Policlonal de conejo |
| COL4A2 (T-15) | Santa Cruz | sc-70246 | 1:1000 | Policlonal de conejo |
| Actina | Sigma | A-5060 | 1:1000 | Policlonal de conejo |
| Anticuerpos 2° | Casa comercial | Referencia | Dilución | |
| Anti Mouse IgG-HRP (Fc) | Thermoscientific | 31437 | 1:5000 | |
| anti Rabbit IgG-HRP (Fc) | Santa Cruz | Sc-3837 | 1:5000 | |

v. *Incubación con el primer y segundo anticuerpo:* a continuación las membranas se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios (Tabla 1) disueltos en seroalbúmina bovina (BSA) 3% en TBT durante 30 min para eliminar los restos de anticuerpo.

Tras estos lavados las membranas se incubaron durante 45 min con los correspondientes anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa de rábano (HRP) y se volvieron a lavar 2 veces con TBT durante 10 min cada uno, siendo el ultimo lavado TBS durante 10 min.

La detección de las proteínas se hizo mediante quimioluminiscencia empleando el kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). Las membranas fueron analizadas con un

lector de imágenes por quimioluminiscencia ImageQuant™ y la ayuda de el programa ImageQuant LAS 4000.

4.3. Técnica de TUNEL

El TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) identifica células apoptóticas *in situ*. El tunel pone de manifiestos los extremos 3'-OH libres generados que han quedado expuestos durante el proceso de fragmentación de la doble cadena de ADN por activación de la endonucleasa endógena, presente en procesos de apoptosis. La enzima transferasa terminal (TdT) incorpora nucleótidos marcados (biotin-dUTP) a dichos extremos. El sitio que está marcado con biotina se revela con fluorescein conjugated avidin (avidin-FITC).

Una vez seleccionados los cortes, se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) 0.01M pH 7.5, 3 veces durante 5 min en agitación. Se realizó un bloqueo con Normal Goat Serum 20%, diluido en PBS+BSA 1% pH 7.1 durante 45 min. Después se lavó bien con PBS. A continuación se incubó con TUNEL: La solución de TUNEL se obtuvo por la dilución del contenido del vial 1 y 2 con PBS y su posterior mezcla. La incubación se hizo a 37°C, en oscuridad durante 1 h. Al finalizar, las muestras fueron lavados con PBS y se montaron con medio de montaje con Dapi (Vectashield®, Vector Lab, UK). Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia.

4.4. Determinaciones inmunohistoquímicas

4.4.1. Inmunohistoquímica para BrdU

Una vez seleccionados los cortes, se realizaron lavados con PBS 0.01 M pH 7.5. Antes de llevar a cabo la unión del anticuerpo es necesario hacer accesible el ADN al anticuerpo primario. Para ello llevamos a cabo un desenmascaramiento:

Las muestras se introdujeron en un baño de PBS-Tritón + Metanol 10% durante 20 min, a temperatura ambiente y en agitación. Los cortes se intrdujeron en un baño con tampón citrato 10 mM pH 8 hirviendo y se mantuvo en agitación durante 30 min a temperatura ambient. A continuación, los portas se colocaron en HCl 2N durante 30 min a 37°C. Los portas se colocaron entonces en un baño de tampón borato 0.1 M pH 8.5 durante 10 min a temperatura ambiente y en agitación, tras lo cual se realizaron lavados con PBS.

Tras el desenmascaramiento se procedió a realizar el bloqueo de la peroxidasa endógena para evitar la reactividad propia del tejido. Para ello incubamos los portas con una solución H₂O₂ al 3% en PBS-Tritón 0.1% + 10% metanol durante 15 min, a temperatura ambiente y en oscuridad.

A continuación, se diluyó el anticuerpo primario anti-BrdU biotinilado (Invitrogen, España) a una concentración 1:200 en suero bovino fetal 20% en PBS-Tritón 0.1%, conocido como tampón bloqueo (TB) y se incubaron los cortes con esta solución *overnight* y oscuridad a 4°C. Al día siguiente se lavaron los cortes con PBS. Se incubaron con ABC (complejo avidina-biotina-

peroxidasa) (Vector Lab, UK) para amplificar la señal, 1 h, a temperatura ambiente. Ese complejo se une a la biotina con la que está marcado el anticuerpo primario. Transcurrido el tiempo, los cortes se lavaron con PBS.

Los cortes se revelaron con DAB sustrato de la peroxidasa (Vector Lab, UK). Una vez se observó que las muestras van adquiriendo un color marrón se cortó la reacción lavando con H₂O bidestilada. A continuación se lavó bien con PBS, se deshidrató con etanol 100° y se montó con medio de montaje (Eukitt®, Sigma Aldrich, España).

Tabla 2. Listado de anticuerpos primarios empleados.

| Anticuerpo 1° | Casa comercial | Nº catálogo | Dilución | Marcaje |
|--|--------------------|-------------|----------|---------------------------|
| Monoclonal anti-mouse BrdU | Sigma Aldrich | B2531 | 1:200 | Proliferación |
| BrdU biotinilado | Invitrogen | A21301NP | 1:200 | Proliferación |
| anti-mouse glial fibrillar acidic protein (GFAP) | Millipore | MAB5628 | 1:200 | Astroцитos |
| Anti-rabbit glial fibrillar acidic protein (GFAP) | Dako Cytomation | Z0334 | 1:500 | Astroцитos |
| Polyclonal anti-rabbit Collagen IV | Abcam | Ab6586 | 1:200 | Colágeno vasos sanguíneos |
| Polyclonal anti-rabbit Iba1 | Wako | 019-19741 | 1:200 | Microglia |
| Monoclonal anti-mouse ED1 | Chemicon | MAB1435 | 1:200 | Macrófago |
| Anti-mouse MAP2 Alexa Fluor® 488 conjugated | Millipore | MAB341X | 1:200 | Neuronas maduras |
| Anti-rabbit to Neuron β-tubulin III (Tuj1) | Abcam | Ab18207 | 1:200 | Neurona inmadura |

4.4.2. Inmunohistoquímica para Iba1

Para llevar a cabo esta inmunohistoquímica no es necesario realizar los pasos correspondientes al desenmascaramiento, ya que nuestro anticuerpo se sitúa de manera accesible en el citoplasma. Por lo que, se incubaron los cortes con la solución de H₂O₂ 3% en PBS-Tritón 0.1% + 10% metanol durante 15 min, a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras este paso, se incubó *overnight* con el anticuerpo primario Iba1 anti-rabbit (Wako, UK) (1:200 en TB). Se realizaron 3 lavados en PBS-Tritón 0.1% y se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario anti-rabbit biotilado (Vector Lab, UK) (1:200 en TB). Se lavó con PBS, se incubó con ABC, se reveló con DAB, se deshidrató y se montó como se describe anteriormente.

Tabla 3. Listado de anticuerpos secundarios empleados.

| Anticuerpo 2º | Casa comercial | Nº catálogo | Dilución | Color de emisión |
|---|------------------------|-------------|----------|------------------|
| Cy3 conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) | Jackson Immunoresearch | 115-165-003 | 1:200 | Rojo |
| Alexa Fluor® 594 donkey anti-rabbit IgG (H+L) | Invitrogen | A21207 | 1:200 | Rojo |
| Alexa Fluor® 488 goat anti-Rabbit Ig G (H+L) | Invitrogen | A11008 | 1:200 | Verde |
| Cy5 conjugated affinipure goat anti-mouse (H+L) | Invitrogen | A10523 | 1:200 | Verde |

4.4.3. Inmunohistoquímica de fluorescencia

Esta técnica se caracteriza por el empleo de anticuerpos que llevan unidos un fluorocromo que al ser excitado con una determinada longitud de onda emiten fotones a otra longitud de onda diferente, siendo un color visible para el ojo.

Todo el proceso será realizado en una cámara húmeda y en oscuridad.

Se seleccionaron los cortes y se lavaron previamente con PBS 0.01 M pH 7.5. A continuación se realizó el bloqueo con TB durante 2 h. Se incubaron con el anticuerpo primario *overnight* a 4°C (Tabla 2).

Al día siguiente, realizaron lavados con PBS-Tritón 0.1% e incubaron con el anticuerpo secundario que lleva el fluoróforo (Tabla 3). Se lavó repetidamente con PBS-Tritón 0.1% y se montó con medio de montaje con DAPI (Vectashield, Vector Lab, UK). Los cortes fueron observados en un microscopio de fluorescencia a una longitud de onda adecuada al fluoróforo.

5. Estudio mediante resonancia magnética 7T

El estudio de imágenes por resonancia magnética funcional (fMRI) es una herramienta para el estudio de la actividad cerebral y los cambios en la plasticidad. Esta técnica se basa en la detección del aumento de aporte de sangre oxigenada a la zona de activación (BOLD) por estimulación eléctrica (Weber et al., 2006). De este modo, los estudios anatómicos y funcionales de los animales se llevaron a cabo con equipo de resonancia magnética de 7 teslas.

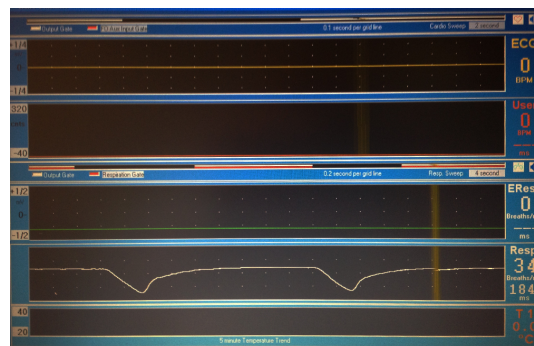


Figura 15. Monitorización de la respiración en la MRI.

Inicialmente se calibró el oxímetro para garantizar que el porcentaje de gases de la mezcla era el correcto. Se abre el gas (N_2O y O_2) hasta llegar a 1 Bar de presión. Conectar los tubos desde las líneas de gas hasta el oxímetro. Regular las columnas de gas para obtener una mezcla de 30% de O_2 y 70% de N_2O . Abrir el vaporizador de isoflurano hasta 4% y abrir la línea de la cámara de inducción. Pesar al animal antes de cada experimento y poner al animal en la cámara de inducción. Después de aproximadamente 5 minutos, cuando el animal está por debajo de 100 respiraciones por minuto (bpm) abrir la línea de gas que va a la plataforma (Figura 15).

Tanto las imágenes del estudio anatómico como los datos del estudio funcional se obtuvieron gracias al programa ParaVision 5.03 de Bruker BioSpin MRI. Cuando acaba el procedimiento, se saca al animal del imán, retirarle los electrodos y sacar al animal de la plataforma. Después, despertar al animal con una inyección intraperitoneal 1 mg/kg de atipamezol (Antisedan®, Pfizer, España).

5.1. Estudio anatómico

Rápidamente llevar al animal a la plataforma, poner la almohadilla debajo del pecho del animal, poner la máscara y reducir el isofluorano hasta 1.5%. Usar la barra de los dientes y de las orejas para fijar la cabeza del animal en el soporte. Colocar la cabeza del animal en el isocentro del imán y comenzar los escáneres. Se emplea el programa ParaVision 5.03 de Bruker BioSpin MRI, se realizan imágenes transversales T2 en dirección antero-posterior cada 1 mm.

5.2. Estudio funcional

Pesar al animal, inyectar 1 mg/kg de medetomidina (Domtor®, Pfizer, España). Preparar un bolo de medetomidina de 0.05 mg/kg y conectarlo a la línea, programando la bomba para liberar 1 ml/hora. Esto proporcionará una infusión continua de 0.1 mg/kg/h de medetomidina al animal. A continuación, llevar al animal a la plataforma y realizar el procedimiento descrito anteriormente. Insertar los electrodos subcutáneos en cada pata. Inyecta el bolo y disminuir el porcentaje de isofluorano gradualmente (5-15 min) controlando la respiración. Después de 15 minutos, encender la bomba de infusión y cerrar el vaporizador.

Colocar la cabeza del animal en el isocentro del imán y empezar el procedimiento de MRI: se realiza un patrón de estimulación-reposo de 45 seg de estimulación seguido de 15 seg de reposo (5:45 min en total). En primer lugar se realiza en el lado contralateral para comprobar que la activación es correcta y a continuación en el lado a analizar. Entre estimulaciones se deja reposar al animal durante 3 min.

6. Obtención y tratamiento de los resultados

6.1. Obtención de imágenes

6.1.1. Microscopía de campo claro

Las imágenes de las tinciones y las imágenes de las muestras en las que se realizó la reacción de la avidina-biotina-peroxidasa, fueron observadas al microscopio de campo claro (Nikon) y fotografiadas mediante una cámara digital (Nikon).

6.1.2. Microscopía de fluorescencia y confocal

Las inmunofluorescencias obtenidas de las muestras fueron observadas al microscopio de fluorescencia (Leica) y fotografiadas con una cámara digital (Nikon DS-Fi1) y/o con un microscopio confocal (Nikon, Confocal Microscope D-Eclipse C1) y fotografiadas con una cámara digital (Nikon).

6.1.3. Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se basa en la irradiación de una muestra delgada con un haz de electrones de densidad de corriente uniforme. Para que se produzca la transmisión de electrones a través de la muestra es necesario que ésta sea delgada (< 100 nm), ya que cuanto menor sea el espesor de la muestra mejor calidad de imágenes se puede obtener. Parte de esos electrones son transmitidos, otra parte son dispersados y otra parte da lugar a interacciones que producen distintos fenómenos como emisión de luz, electrones secundarios y Auger, rayos X, etc.

Todas estas señales se pueden emplear para obtener información sobre la naturaleza de la muestra como morfología, composición, estructura cristalina, estructura electrónica, etc. De modo que, las muestras tratadas para este fin fueron observadas al microscopio electrónico de transmisión (Leica) y se obtuvieron imágenes digitales de las zonas colindantes a la lesión, con el objetivo de estudiar las características estructurales del tejido y de los tipos celulares presentes.

6.2. Contaje y análisis estadístico

Los recuentos se realizaron en 4 cortes de cada animal ($n=6$) a partir de las inmunohistoquímicas realizadas. En el caso del primer estudio (criolesión + ácido lipoico), se delimitaron las primeras 500 μm colindantes a la lesión. En el caso del segundo estudio (criolesión + biomaterial + ácido lipoico), la finalidad era poder cuantificar el número total de células adheridas y/o el número de células diferenciadas dentro del biomaterial. En ambos casos, se tomaron aleatoriamente 6 microfotografías de las cuales se hicieron los recuentos. Los recuentos celulares se realizaron mediante el análisis de las microfotografías con la ayuda del programa ImageJ 1.46q para Mac. El número de células se calculó por la colocación entre los núcleos marcados con Dapi y el marcador citoplasmático correspondiente y se refirió al área total de estudio. El área ocupada por un tipo celular fue calculada mediante el área ocupada por el marcador correspondiente y también fue referida al área total medida.

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos fueron expresados como la media \pm la desviación estándar. El tratamiento de los datos se realizó con la ayuda del programa estadístico GraphPad Prism 4 para Mac. Para realizar el estudio estadístico entre dos grupos se empleó un T-test. Para el análisis estadístico de más de dos grupos se empleó el análisis de la varianza de una vía (one-way ANOVA) seguido de Fisher's LSD test. Mientras que para la comparación de dos

variables se realizó un análisis de la varianza de dos vías (two-way ANOVA), y un post-test de Bonferroni. En todos los casos se tomó el 95% como nivel de significatividad mínimo.

RESULTADOS

1. Estudio del tratamiento con ácido lipoico tras el modelo de criolesión

1.1. Efecto del ácido lipoico sobre el tejido cerebral

Para corroborar que el ácido lipoico era capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y hacer su efecto sobre el tejido cerebral como antioxidante, se realizó un test de capacidad antioxidante mediante Elisa en el tejido cerebral y se midieron los valores de GSH mediante HPLC a los 7 días.

En la figura 16 se muestran los valores de $ABTS^+$ obtenidos del test de capacidad antioxidante. Estos valores son inversamente proporcionales a la capacidad antioxidante del tejido, es decir, que cuanto mayor sea la concentración de $ABTS^+$ obtenida en la muestra, menor será la capacidad antioxidante del tejido. De este modo, los animales no tratados (CR) (Figura 16.A) presentaron una menor capacidad antioxidante que los animales control ($p < 0.001$). Por otro lado, en los animales tratados con LA (CR+LA) la capacidad antioxidante incrementaba significativamente ($p < 0.01$) comparado con el grupo no tratado.

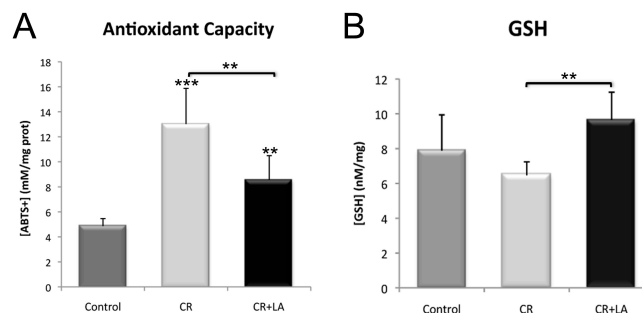


Figura 16. Capacidad antioxidante del tejido cerebral a los 7 días de la lesión mediante ELISA (A). Medidas de GSH mediante HPLC (B). Control: animales sin ningún tipo de lesión ni tratamiento; CR: animales con criolesión; CR+LA: animales con criolesión y tratados con LA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

La figura 16.B muestra que los niveles de GSH en animales control fueron mayores que animales no tratados (CR) y menores que en animales tratados (CR+LA) aunque no estadísticamente significativo. Sin embargo, la concentración de glutatión era mayor ($p < 0.01$) en animales tratados (CR+LA) comparado con los no tratados (CR).

1.2. Caracterización del modelo de criolesión

1.2.1. Estudio histológico de la zona afectada

Con el objetivo de caracterizar la morfología e histología de la lesión cortical, se realizó una tinción de hematoxilina-eosina. La criolesión fue pues, realizada satisfactoriamente como se muestra en la sección coronal (Figura 17.A) y transversa (Figura 17.B). Esta estaba localizada cerca del ventrículo lateral (LV) (Figura 17.C) y un aumento de la lesión muestra la apariencia histológica de la lesión (Figura 17.D).

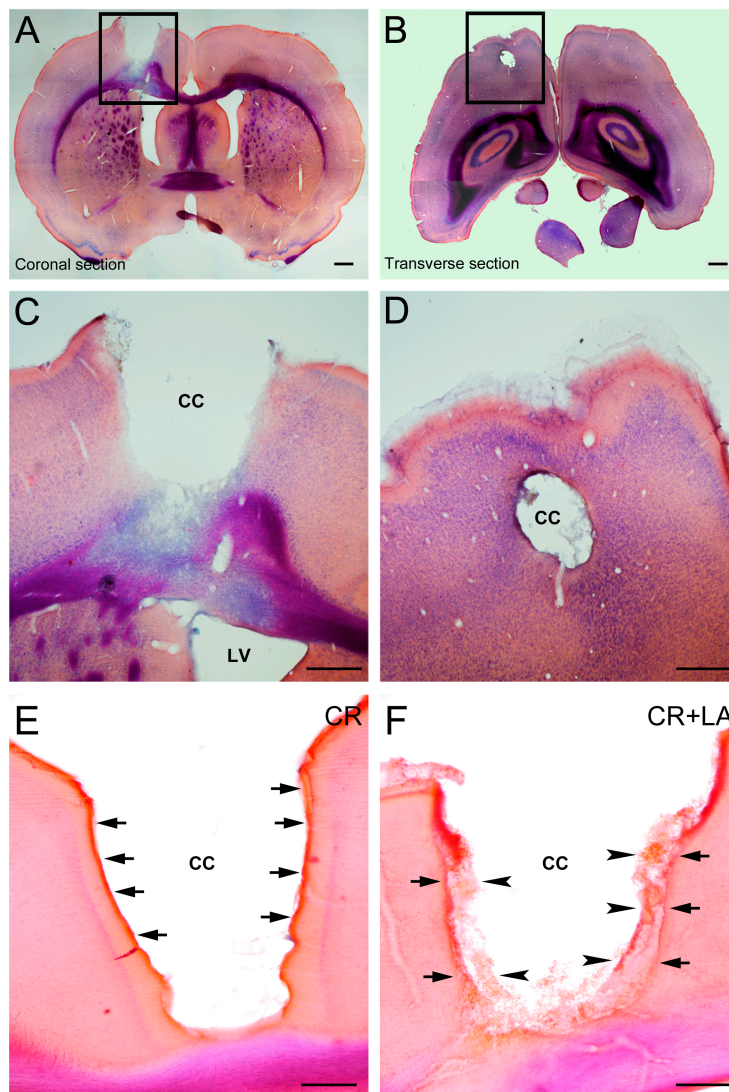


Figura 17. Tinción de hematoxilina-eosina de la lesión, situada próxima al ventrículo lateral (LV) en una sección coronal (A, C) y una sección transversa (B, D). Una imagen de la cavidad cística (CC) de una animal no tratado (CR) y uno tratado con LA (CR+LA). Las flechas indican el límite de la cavidad cística (CC) y las cabezas de flecha indican la extensión del tejido dentro de la cavidad cística. Barras de escala: 500 μ m en A, B, C, D; 250 μ m en E, F.

En los animales no tratados con LA, se encontró una cavidad cística (CC) completamente definida y delimitada (flechas en la Figura 17.E). Contrariamente, en los animales tratados con LA, la CC no estaba tan bien definida por la presencia de tejido neural (cabezas de flecha en la Figura 17.F) creciendo dentro de la CC desde el borde de la lesión (flechas en la Figura 17.F).

Cuando el área adyacente de la lesión fue examinada con más detalle mediante TEM, se observaron diferencias obvias en la evolución del tejido neural a los 15 días, comparando los animales no tratados con los tratados con LA. Una imagen de un corte semifino de una animal no tratado muestra tres zonas perfectamente delimitadas (Figura 18.A) a lo largo de la lesión. La primera zona colindante a la CC es la delimitada por la cicatriz glial (GS). A continuación hay una zona dañada (DZ) caracterizada por la existencia de múltiples espacios intercelulares, células en proceso de apoptosis y algunas células de microglia. Por último, la tercera zona o zona intacta (IZ), está compuesta por tejido neural que no ha sufrido ningún cambio por la lesión. Cerca de la CC observamos la cicatriz glial con más detalle en una imagen obtenida por TEM (Figura 18.B), y podemos observar una gran cantidad de filamentos intermedios en estas células de astroglia que forman la GS (asteriscos en la Figura 18.C), estos se sitúan paralelos al borde de la lesión creando una barrera.

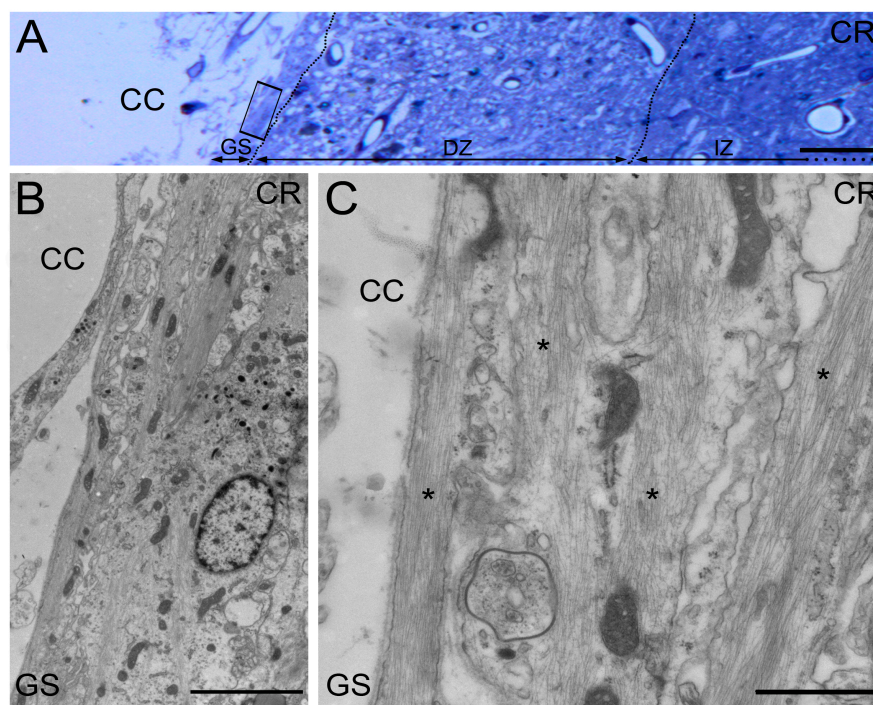


Figura 18. Fotografía de un semifino (A) de un animal no tratado (CR). Las líneas punteadas delimitan las tres zona principales. CC: cavidad cística; GS: cicatriz glial; DZ: zona dañada; IZ: zona intacta. Imágenes obtenidas por TEM de la cicatriz glial (B, C). Los asteriscos indican los filamentos intermedios de las células gliales. Barras de escala: 50 μm en A; 5 μm en B and 1 μm en C.

Por otro lado, los animales tratados con LA (CR+LA) presentaban pocas diferencias entre las tres zonas (Figura 19.A). En la primera zona no existía una cicatriz glial, en lugar de ello había una zona de regeneración (RZ), en la que el tejido había crecido hasta invadir parte de la CC, encontramos pues una zona en proceso de remodelación. Las siguientes dos zonas se presentan igual que en los animales no tratados: una zona dañada (DZ) y una zona intacta (IZ) con las mismas características descritas anteriormente.

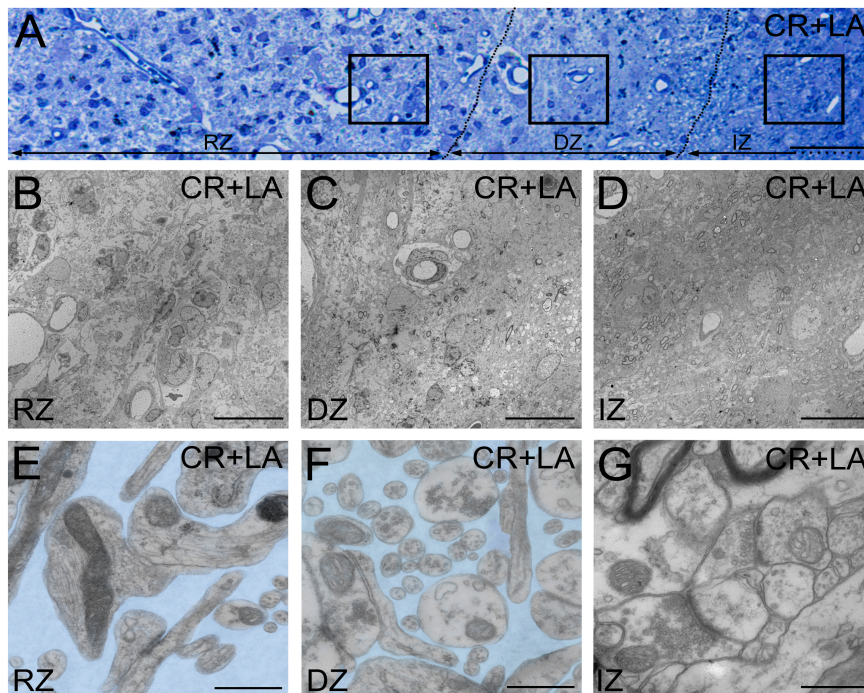


Figura 19. Fotografía de un semifino (A) de un animal tratado con LA (CR+LA). Las líneas punteadas delimitan tres zona principales. RZ: zona de regeneración; DZ: zona dañada; IZ: zona intacta. Imágenes obtenidas por TEM de cada una de las zonas (B, C, D, E, F, G). El color azul indica la presencia de espacios intercelulares. Barras de escala: 50 µm en A; 20 µm en B, C, D; 600 nm en E, F,

Las imágenes tomadas con TEM muestran la presencia de vasos sanguíneos y células gliales en la RZ (Figura 19.B), la DZ (Figura 19.C) y la IZ (Figura 19.D). En la RZ se aprecia una gran cantidad de espacios intercelulares (color azul en la Figura 19.E), los cuales disminuyen a lo largo de la DZ (Figura 19.F). Sin embargo, en la IZ ya no hay presencia de espacios intercelulares (Figura 19.G) y encontramos una zona de tejido completamente sano, con axones perfectamente formados.

1.3. Estudio citológico de la zona lesionada

1.3.1. Efecto del ácido lipoico sobre la supervivencia celular

Una de las principales consecuencias de las lesiones cerebrales es la muerte celular. La técnica de TUNEL fue usada para analizar el efecto del tratamiento con LA sobre la supervivencia celular, 15 días después de la lesión cerebral. El test fue llevado a cabo en secciones de animales no tratados (CR) y animales tratados (CR+LA) en las primeras 500 μm desde la CC, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de la densidad de células muertas (n° células/ mm^2) (Figura 20) en animales tratados con LA comparado con animales no tratados.

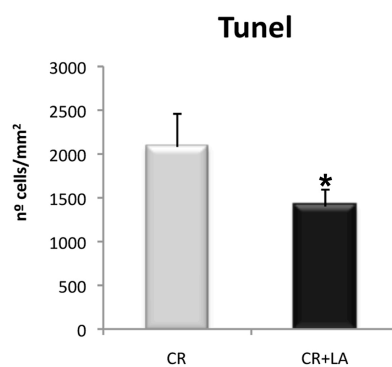


Figura 20. Densidad de células TUNEL⁺ (n° células/ mm^2) en la zona de la lesión. * $p < 0.05$.

1.3.2. Estudio de la proliferación y la diferenciación

Con el objetivo de evaluar la proliferación de células cerca de la lesión se llevaron a cabo inmunohistoquímicas para BrdU en animales no tratados (Figura 21.A) y animales tratados (Figura 21.B) 15 días después de la lesión. Encontramos que la densidad de células BrdU positivas (Figura 21.C) estaba aumentada ($p < 0.05$) en los animales tratados comparado con los no tratados.

Además pudimos observar que las células BrdU positivas encontradas en los animales no tratados se disponían a lo largo del límite de la lesión, mientras que en los animales tratados con LA, estas células están dispersas por toda la zona lesionada colindante.

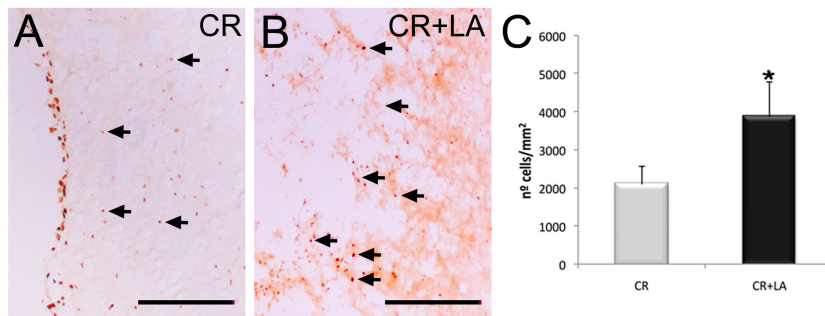


Figura 21. Inmunohistoquímica para BrdU (flechas) en la zona lesionada de animales no tratados (A) y animales tratados (B). Densidad de células BrdU+ (nº células/mm²) e la zona lesionad (C). Barras de escala: 500 µm. *p < 0.05.

Realizamos inmunofluorescencias para determinar si estas nuevas células habían diferenciado en algún tipo celular específico 15 días después de la lesión. Los estudios de colocalización mostraron que muchas de estas células BrdU positivas se diferenciaban en astrocitos (GFAP) (Figura 22.A) y vasos sanguíneos (Collagen IV) (Figura 22.B) en los animales tratados con LA.

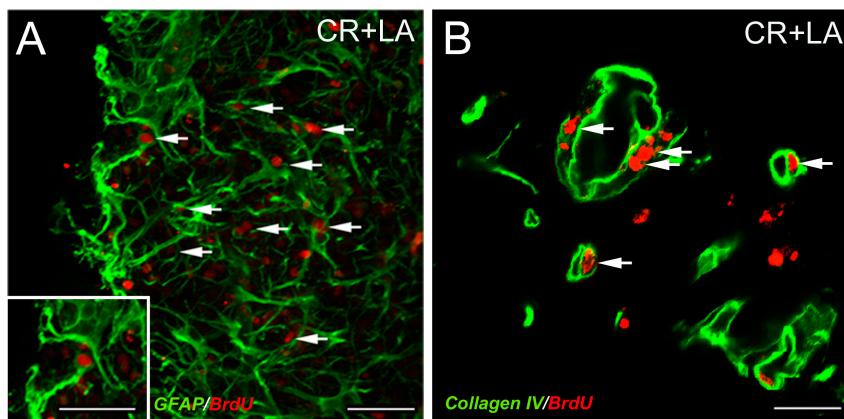


Figura 22. Inmunofluorescencia para BrdU (rojo), GFAP (verde) (A) y Collagen IV (verde) (B) en animales tratados con LA. Las flechas indican colocalizaciones entre ambos marcadores. Barras de escala: 100 µm en A; 50 µm en B.

1.3.3. Estudio angiogénico tras el tratamiento

En este estudio, era de gran interés evaluar la capacidad angiogénica del ácido lipoico, por ello la presencia de los vasos sanguíneos fue evaluada mediante una inmunofluorescencia

para Collagen IV. En los animales no tratados, los vasos sanguíneos aparecen con una distribución a lo largo de la lesión (Figura 23.A). Mientras que en los animales tratados con LA los vasos se disponen perpendicularmente a la lesión (Figura 23.B).

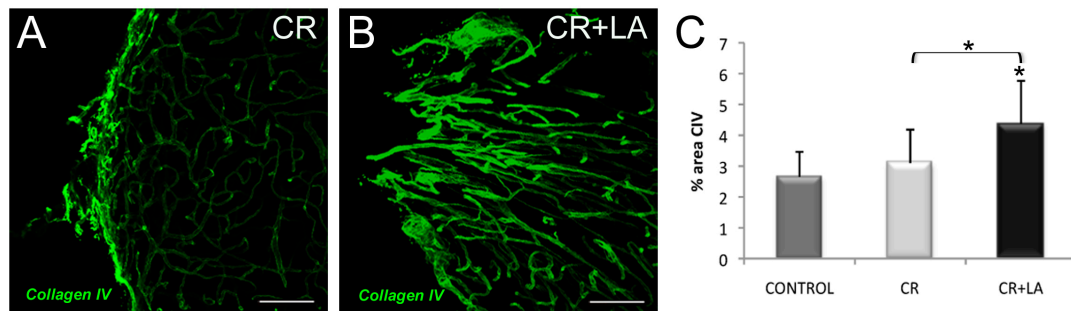


Figura 23. Inmunofluorescencia para Collagen IV en animales no tratados (A) y animales tratados con LA (B). Porcentaje de área ocupada por los vasos sanguíneos (C). Barras de escala: 200 µm.

La cuantificación del área ocupada por los vasos sanguíneos (% área CIV) (Figura 23.C) muestra un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en los animales tratados con LA comparado con los no tratados y con los animales control.

Para entender un poco más a cerca del mecanismo molecular de la formación de estos vasos sanguíneos, se administró bevacizumab (Avastin), un agente bloqueante de VEGF. Se realizaron electroforesis y Western blot para VEGF para corroborar el efecto de Bevacizumab sobre VEGF y para COL4A2 para ver como afectaba a la síntesis de colágeno (Figura 24.A).

La cuantificación del western blot (Figura 24.B) mostró que tras la administración de bevacizumab (CR+AV y CR+AV+LA) había un descenso en los valores de VEGF y, consecuentemente, también un descenso estadísticamente significativo ($p < 0.001$) en los valores de colágeno comparado con el grupo control (CR y CR+LA respectivamente), indicando que VEGF, al menos en parte, es responsable de la síntesis de colágeno. Sin embargo, los valores de colágeno sufrieron un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.001$) en los animales tratados con LA (CR+AV+LA) comparado con los animales no tratados (CR+AV), mostrando que LA es capaz de estimular la síntesis de colágeno por sí mismo.

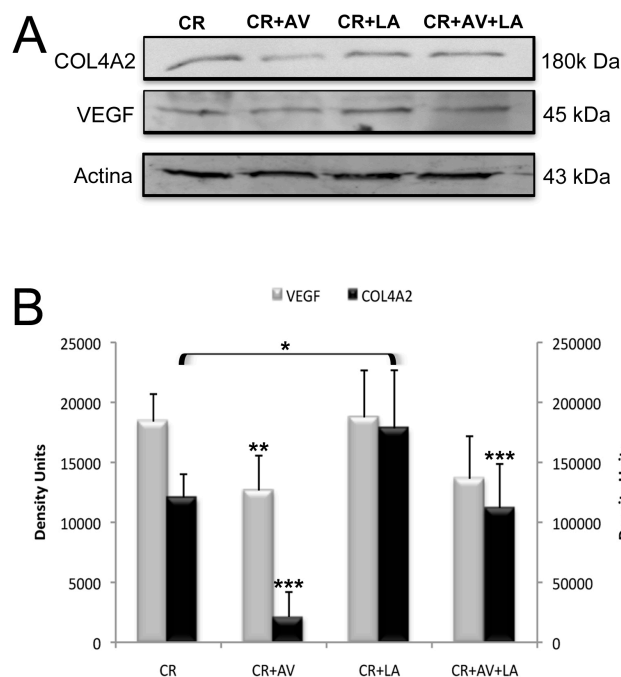


Figura 24. Imagen del western blot de las proteínas COL4A2 y VEGF (A). Cuantificación del western blot por densitometría (B). CR: animales no tratados; CR+AV: administración de bevancizumab en animales no tratados; CR+LA: animales tratados con LA; CR+AV+LA: administración de bevancizumab en animales tratados con LA. CR vs CR+LA*; CR+AV vs CR+AV+LA***. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

1.3.4. Reactividad astrogliar tras el tratamiento

La reactividad astrogliar es uno de los grandes problemas asociados a las lesiones cerebrales, por ello quisimos evaluar de la reactividad glial tras el tratamiento con ácido lipoico. Para llevar a cabo este fin, se realizaron en primer lugar, inmunofluorescencias con el marcador GFAP (astrocitos).

El tratamiento con LA claramente disminuyó la cicatriz glial alrededor de la lesión después de 15 días (Figura 25.A y 25.B). La evaluación de las células de la cicatriz glial en la zona lesionada mostraron diferencias morfológicas en ambos grupos y aparentemente existía un aumento del número de células gliales en los animales no tratados (Figura 25.C), comparado con los tratados con LA (figura 24.D). Por otro lado, la cuantificación de la densidad de astrocitos (nº células GFAP+/mm²) (Figura 25.E) mostró que había un aumento estadísticamente significativo en ambos grupos experimentales respecto al control (p < 0.01), pero no encontramos diferencias entre ambos grupos experimentales. Si embargo, encontramos un aumento estadísticamente significativo en el área ocupada por estos astrocitos en los animales no tratados (Figura 25.F) respecto al grupo tratado con LA (p < 0.01) y el grupo control (p < 0.001).

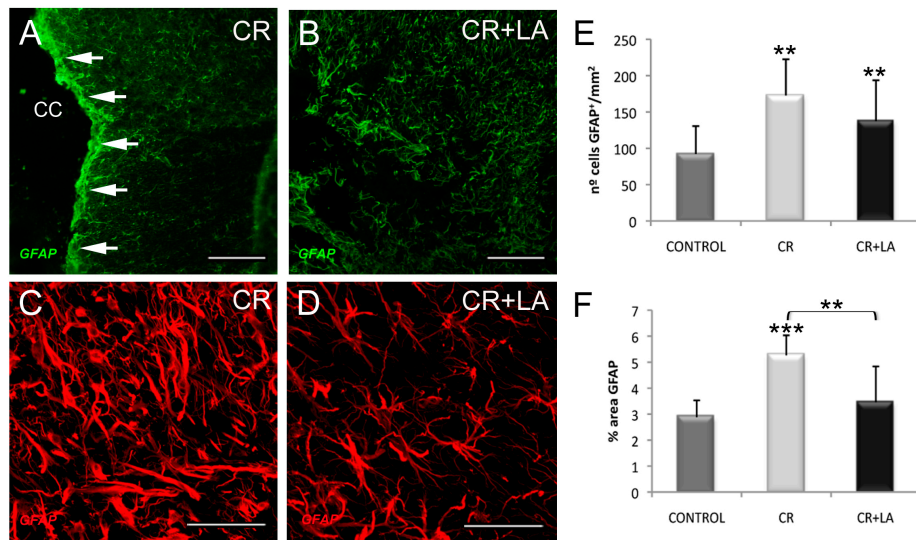


Figura 25. Inmunofluorescencia de GFAP en animales no tratados (A) y animales tratados con LA (B). Las flechas indican la cicatriz glial formada en los animales no tratados. Barras de escala: 200 μm en A, B; 200 μm en C, D. Densidad de células GFAP+ (n° células / mm^2) (E) y área (% área) ocupada por estas células (F). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Por otro lado, se procedió a evaluar la formación de la BBB mediante inmunofluorescencias dobles con los marcadores GFAP (astrocitos) y Collagen IV (vasos sanguíneos) en los animales control (Figura 26.A), en los animales lesionados no tratados (Figura 26.B) y en los animales lesionados tratados con LA (Figura 26.C).

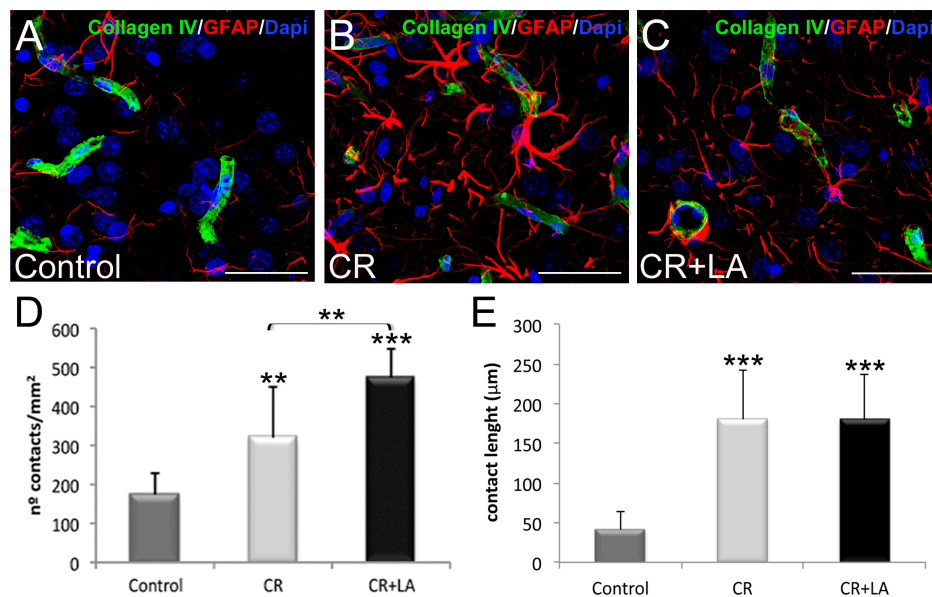


Figura 26. Inmunofluorescencia de GFAP (astrocitos) y Collagen IV (vasos sanguíneos) en animales control (A), lesionado no tratado (B) y lesionado tratado con LA (C). Barras de escala: 50 μm . Cuantificación de la densidad de contactos (n° contactos / mm^2) (D) y de la longitud total de los contactos (μm) en cada uno de los grupos experimentales. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

La cuantificación de la densidad de los contactos (n° contactos/ mm^2) (Figura 26.D) mostró que existía un aumento estadísticamente significativo de estos en ambos grupos experimentales (CR y CR+LA) comparado con el control ($p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente). Así mismo, existía un aumento en la densidad de los contactos en los animales tratados con LA comparado con los no tratados ($p < 0.01$).

Sin embargo, cuando se evaluó la longitud total de los contactos (μm), se encontró un aumento estadísticamente significativo entre los grupos experimentales y el control ($p < 0.001$).

1.3.5. Respuesta microglial

Para observar la respuesta microglial después de la lesión, se realizaron inmunohistoquímicas para Iba1. Las imágenes muestran las células de microglía presentes en los animales no tratados (Figura 27.A), las cuales presentaban una morfología estrellada. En cambio, en los animales tratados con LA (Figura 27.B) se podía observar una morfología redondeada o amebode en estas células. Al realizar la cuantificación (Figura 27.C), pudimos observar un aumento estadísticamente significativo en ambos grupos experimentales (CR y CR+LA) comparado con el grupo control ($p < 0.001$).

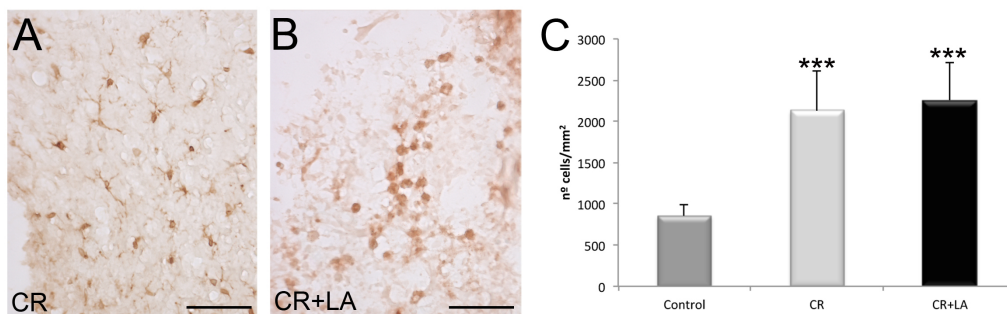


Figura 27. Inmunohistoquímica para Iba1 en animales no tratados (A) y animales tratados con LA (B). Barras de escala: 100 μm . Cuantificación de la densidad de células Iba1 positivas (n° células / mm^2) en cada grupo experimental (C). *** $p < 0.001$.

Para evaluar si estas células de microglía presentaban actividad macrófaga, se realizaron inmunofluorescencias para ED1. Las imágenes en los animales no tratados (Figura 28.A) muestran escasa presencia de células ED1 positivas; en cambio, en los tratados con LA (Figura 28.B) se puede observar una gran cantidad de estas células.

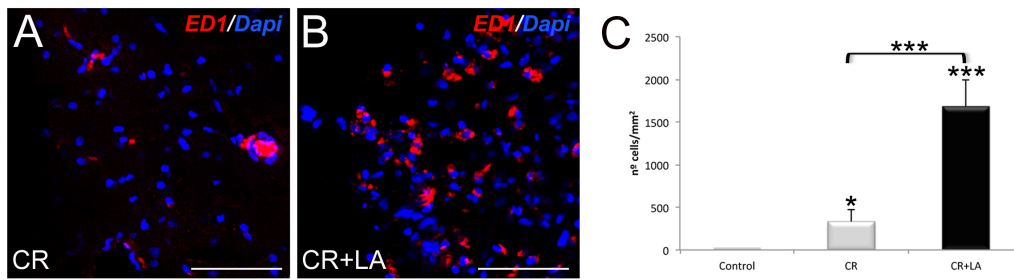


Figura 28. Inmunofluorescencia para ED1 en animales no tratados (A) y animales tratados con LA (B). Barras de escala: 200 μ m. Cuantificación de la densidad de células ED1 positivas (n° células / mm²) en cada grupo experimental (C). *p < 0.05; ***p < 0.001.

Se realizaron recuentos de la densidad de estas células (n° células/mm²) (Figura 28.C), pudiendo observar un aumento estadísticamente significativo de células ED1 positivas en los animales no tratados (p < 0.05), siendo mucho mayor en los tratados con LA (p < 0.001) respecto al control. Al mismo tiempo, se observó un aumento estadísticamente significativo de la densidad de células ED1 en los animales tratados con LA respecto a los no tratados (p < 0.001).

1.4. Estudio molecular de pCREB y BDNF

Debido a su importante papel como factores tróficos, se realizaron western blot de las proteínas pCREB y BDNF (Figura 29.A) 15 días después de la lesión.

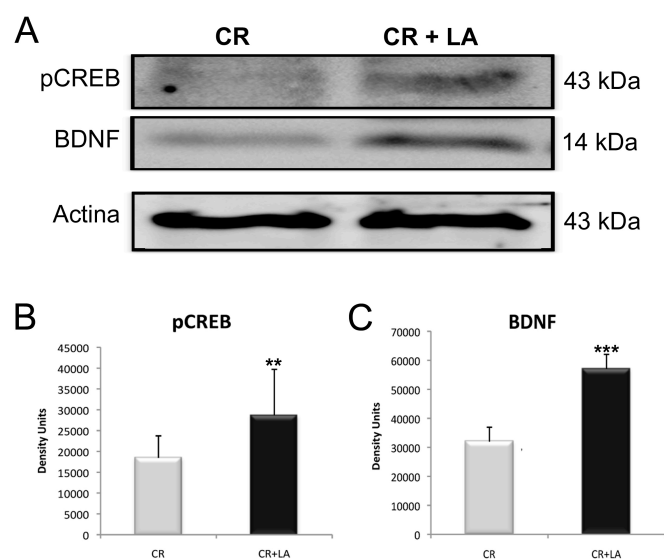


Figura 29. Western blot para las proteínas pCREB y BDNF (A): Cuantificación mediante densitometría de pCREB (B) y BDNF (C) en ambos grupos experimentales. **p < 0.01; ***p < 0.001.

La cuantificación por densitometría de los western blot mostró un aumento estadísticamente significativo de las proteínas pCREB (Figura 29.B) y BDNF (Figura 29.C) en los animales tratados con LA comparado con los no tratados ($p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente).

2. Estudio del uso combinado de biomateriales y ácido lipoico tras el modelo de criolesión

2.1. Estudio histológico de la implantación del biomaterial

El objetivo inicial en esta segunda parte del estudio consistía en evaluar la inserción del biomaterial polimérico dentro de la zona lesionada. La implantación del biomaterial se llevó a cabo satisfactoriamente en las coordenadas descritas anteriormente (ver apartado 2.1 de *Material y métodos*), cerca de la zona subventricular (Figura 30.A). En ninguno de los casos se produjo rechazo del mismo por parte del animal, por lo que se pudo concluir que el biomaterial resultaba compatible con el tejido cerebral. Además, se pudo observar cierta continuidad entre el tejido cerebral y el biomaterial (figura 30.B).

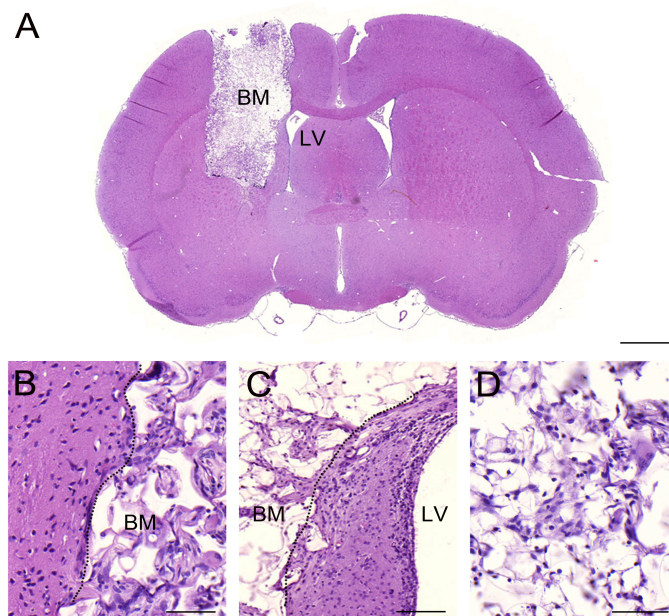


Figura 30. Tinción de hematoxilina-eosina de una sección coronal del cerebro con el biomaterial (A). Limite entre el tejido antiguo y el biomaterial (B). Implante del biomaterial junto al LV (C). Imagen del BM (D). La línea punteada delimita el tejido neural del biomaterial. BM: biomaterial; LV: ventrículo lateral. Barras de escala: 500 μm en A, 100 μm en B, y 500 μm en C y D.

Por otro lado, era importante que el biomaterial quedara perfectamente insertado cerca del ventrículo lateral (Figura 30.C) para facilitar el acceso al mismo de las células en proliferación de la SVZ (si las hubiera), y al cabo de un tiempo el biomaterial fue, de hecho, colonizado por una gran cantidad de células (Figura 30.D).

La tinción de hematoxilina-eosina mostró que, aparentemente los animales no tratados (Figura 31.A y 31.B) presentaban una menor densidad celular dentro del biomaterial que los animales tratados con LA (Figura 31.C y 31.D), o al menos sus células presentaban más expansiones citoplasmáticas.

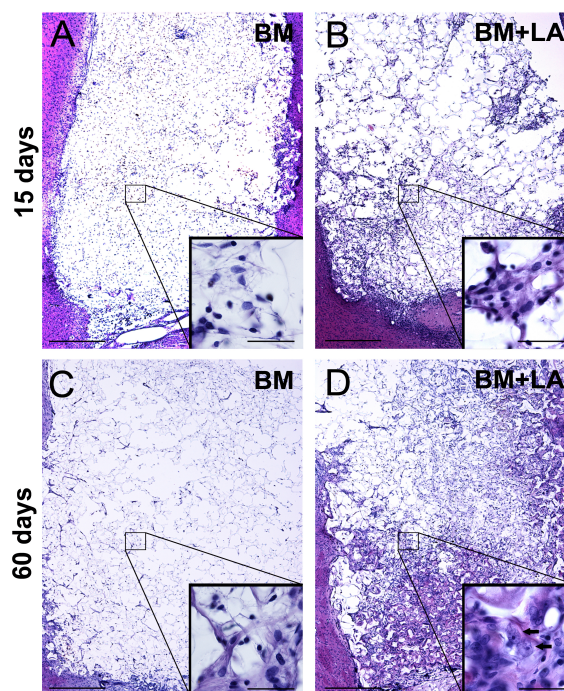


Figura 31. Tinción de hematoxilina-eosina del interior del biomaterial. BM: biomaterial; BM+LA: biomaterial y tratamiento con ácido lipoico. Barras de escala: 200 μ m y 50 μ m en las ampliaciones.

Para confirmar esta observación, se llevó a término el recuento de la densidad celular dentro del biomaterial (Figura 32), desvelando que, la densidad celular dentro del biomaterial a los 15 días era mucho menor en los animales no tratados ($p < 0.001$) que en los animales tratados con LA ($p < 0.05$) comparado con el control, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales. Sin embargo, a los 60 días, el grupo tratado con LA sufrió un incremento estadísticamente significativo si lo comparáramos con el grupo no tratado ($p < 0.05$) y la densidad celular llegó a equipararse con valores control.

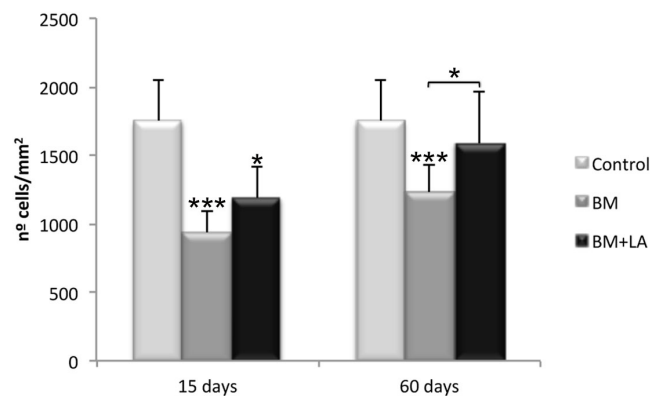


Figura 32. Densidad de células (n° células/ mm^2) presentes dentro del biomaterial para cada uno de los grupos a diferentes tiempos. Control: sin lesión ni biomaterial; BM: con lesión y biomaterial pero sin tratamiento; BM+LA: con lesión, biomaterial y tratamiento con LA.

2.2. Estudio de la angiogénesis en el interior del biomaterial

El aporte de oxígeno y nutrientes es una de las condiciones esenciales para el desarrollo de un tejido. Para ello es imprescindible la presencia de vasos sanguíneos dentro del tejido, por lo que el siguiente paso del estudio se centraba en la evaluación de la angiogénesis dentro del biomaterial. Para llevar a cabo dicho estudio, se realizaron inmunofluorescencias para Collagen IV (vasos sanguíneos) en los animales tratados y no tratados, a los 15 y 60 días posteriores a la lesión (Figura 33.A-L).

Se realizaron recuentos de la densidad de células Collagen IV positivas (Figura 33.M), encontrando un aumento estadísticamente significativo en el grupo tratado con LA respecto al no tratado ($p < 0.01$). Sin embargo, a los 60 días encontramos que, ambos grupos experimentales sufrieron un aumento estadísticamente significativo respecto al grupo control ($p < 0.01$).

Por otro lado, se calculó el porcentaje de células colágeno positivas (Figura 33.N), en este caso, encontramos, a los 15 días, un descenso en el grupo no tratado ($p < 0.05$) y un aumento en el tratado con LA ($p < 0.001$) respecto al control, y al mismo tiempo, encontramos diferencias entre ambos grupo experimentales ($p < 0.001$). En cambio, a los 60 días, observamos un aumento estadísticamente significativo en el grupo no tratado comparado con el control y el grupo tratado con LA ($p < 0.01$). Así mismo, el grupo tratado con LA sufrió un descenso significativo en el porcentaje de células, situándose en valores control.

Además, se calculó el porcentaje de área ocupada por los vasos sanguíneos (Figura 33.O), encontrando un aumento estadísticamente significativo del área ocupada por los vasos sanguíneos en los animales tratados con LA respecto al grupo no tratado, a los 15 y 60 días ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectivamente), y respecto al control a los 60 días ($p < 0.001$).

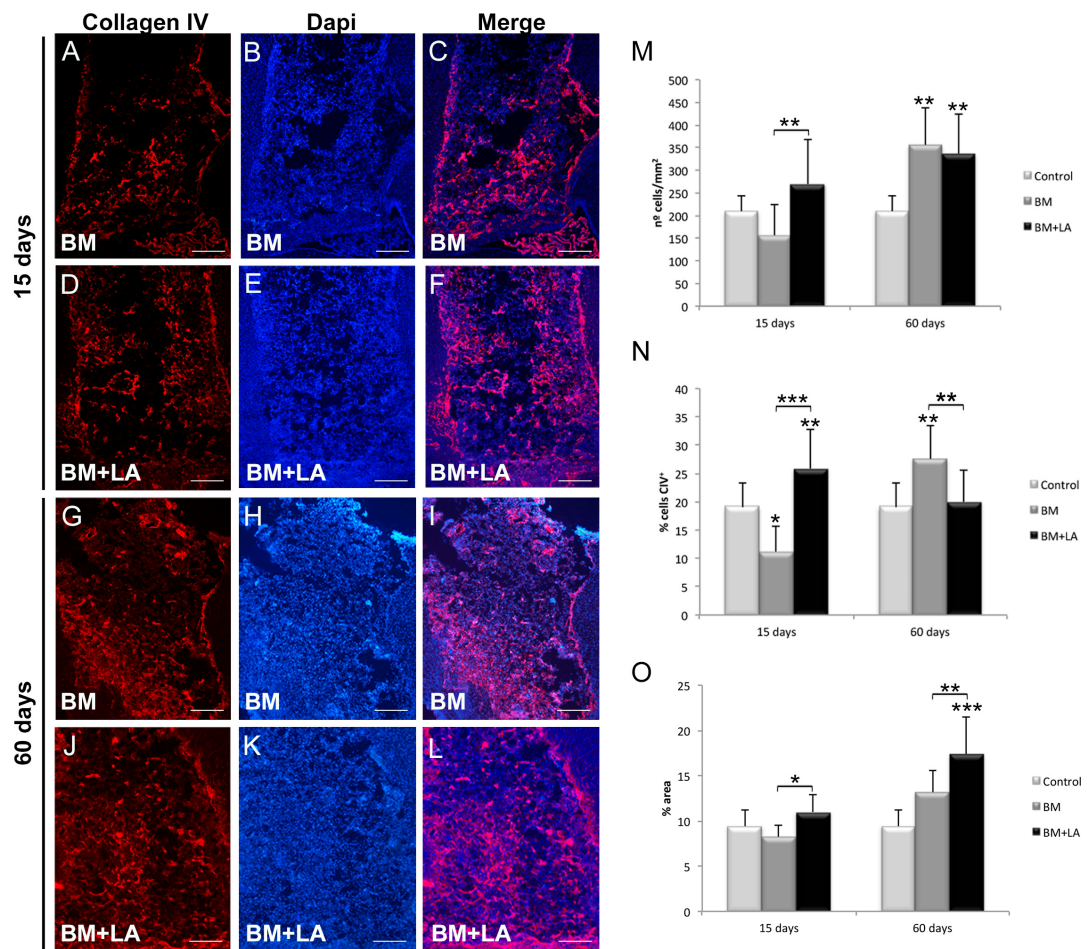


Figura 33. Inmunofluorescencia de Collagen IV (vasos sanguíneos) a los 15 días en animales no tratados (A-C) y animales tratados con LA (D-F); y a los 60 días en animales no tratados (G-I) y animales tratados con LA (J-L). Las gráficas representan la cuantificación de la densidad de células colágeno positivas (n° células / mm²) (M), el porcentaje de células (% células CIV+) (N) y el porcentaje de área ocupada por los vasos sanguíneos (O). Barras de escala: 200 μ m. *p < 0.05; **p < 0.01; p < 0.001.

2.3. Estudio de la reactividad glial dentro del biomaterial

Uno de los puntos importantes del estudio, era evaluar el efecto del implante del biomaterial sobre la reactividad glial para observar si este producía algún tipo de respuesta inflamatoria por parte del tejido cerebral. Para ello evaluamos tanto la astrogliá como la microglia.

2.3.1. Estudio de la astrogliá

Para el estudio de la astrogliá en el interior del biomaterial se realizaron inmunofluorescencias con el anticuerpo GFAP (astrocitos) en los animales tratados y no tratados con LA, a los 15 y 60 días (Figura 34.A-L).

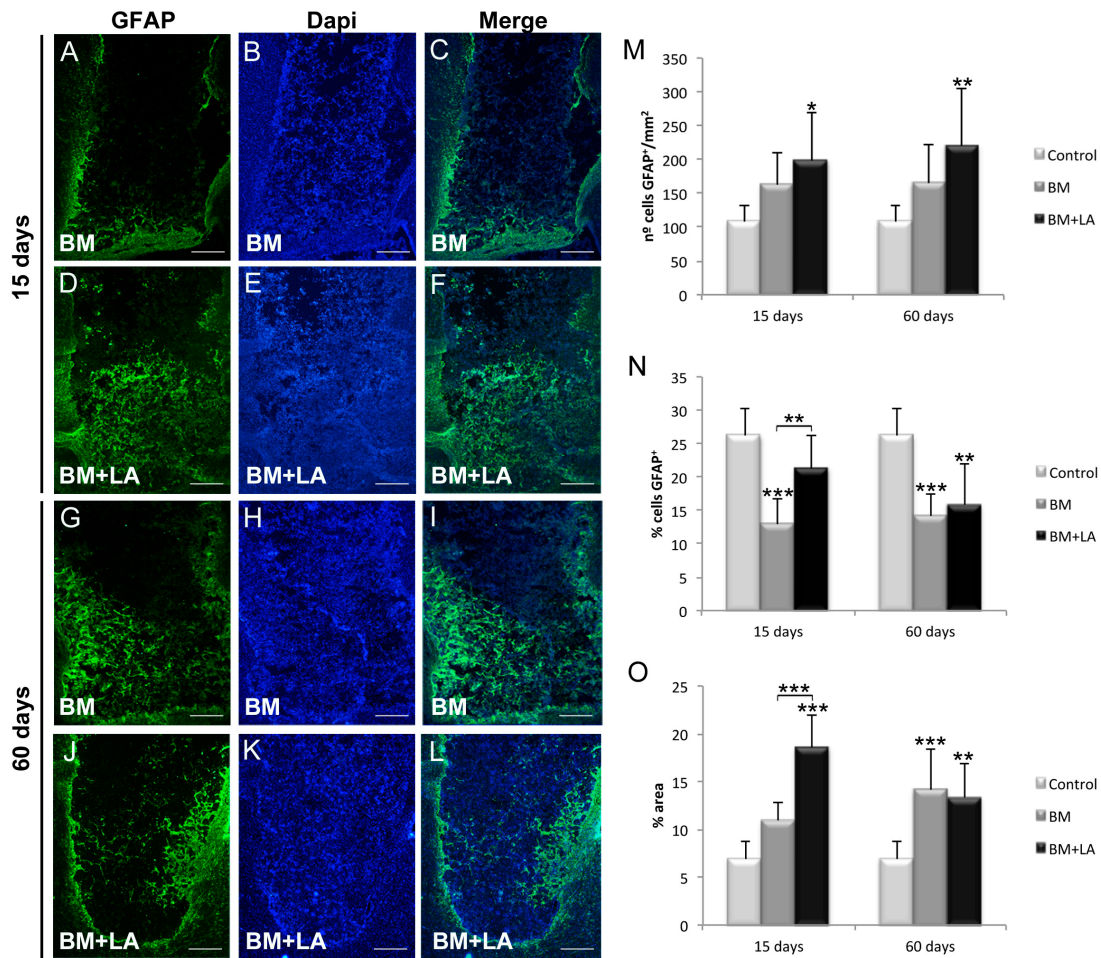


Figura 34. Inmunofluorescencia de GFAP (astrocitos) a los 15 días en animales no tratados (A-C) y animales tratados con LA (D-F); y a los 60 días en animales no tratados (G-I) y animales tratados con LA (J-L). Las gráficas representan la cuantificación de la densidad de células colágeno positivas (n° células/mm²) (M), el porcentaje de células (% células GFAP+) (N) y el porcentaje de área ocupada por los astrocitos (O). Barras de escala: 200 μ m. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

Se realizaron recuentos de la densidad de células GFAP positivas (Figura 34.M), encontrando a ambos tiempos (15 y 60 días) un incremento en la densidad celular en los animales tratados con LA respecto al control ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectivamente). Por otro lado, se calculó el porcentaje de células GFAP positivas (Figura 34.N), en este caso encontramos que, existía un incremento estadísticamente significativo en los animales tratados con LA comparado con los no tratados ($p < 0.01$) y, por otro lado, los animales no tratados mostraban una disminución estadísticamente significativa comparado con el control ($p < 0.001$).

Además, se calculó el porcentaje de área ocupada por los astrocitos (Figura 34.O). A los 15 días encontramos que el grupo tratado con LA sufrió un incremento estadísticamente significativo en el área ocupada por los astrocitos comparado con el grupo no tratado y el control ($p < 0.001$). En cambio, a los 60 días, se produjo un aumento estadísticamente significativo en el grupo no tratado comparado con el control ($p < 0.001$). Y, por otro lado, el grupo tratado con LA sufrió una disminución en el área ocupada por los astrocitos.

2.3.2. Estudio de la microglía

El estudio de la presencia y morfología de células de microglía se llevó a cabo realizando inmunofluorescencias para el marcador Iba1, al mismo tiempo que se realizaron inmunofluorescencias para ED1 con el objetivo de observar las células con capacidad macrófaga (Figura 35).

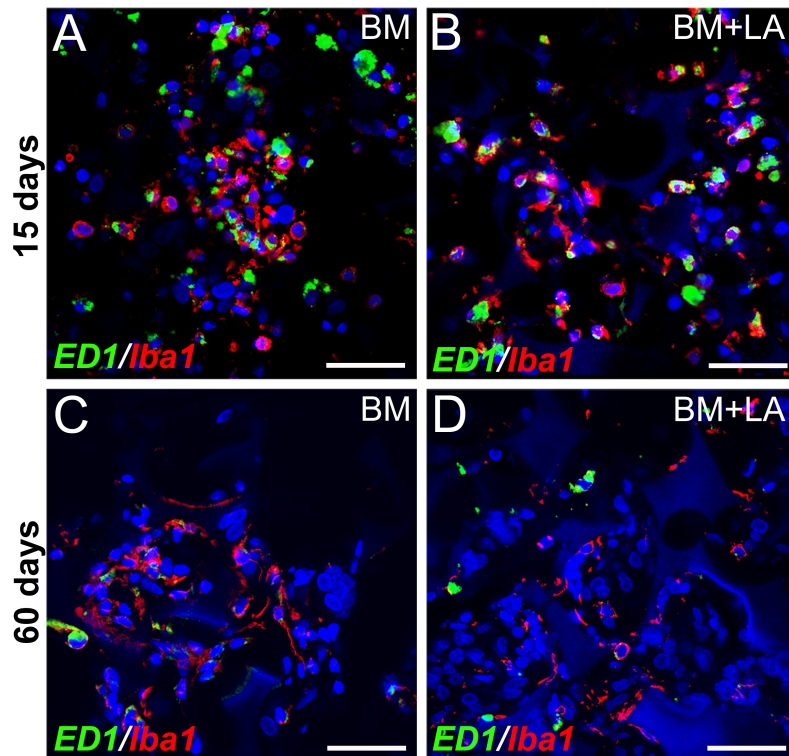


Figura 35. Inmunofluorescencia para ED1 e Iba1 a los 15 días en los animales no tratados (A) y los animales tratados con LA (B); y a los 60 días en los animales no tratados (C) y los animales tratados con LA (D). Barras de escala: 50 μ m.

Se realizaron recuentos de la densidad de células Iba1 positivas (Figura 36.A) encontrando un aumento significativo en los grupos experimentales respecto al control, tanto a los 15 días como a los 60 días. Por otro lado, el porcentaje de células Iba1 positivas (Figura 36.B) sufrió, a los 60 días, un aumento estadísticamente significativo en el grupo tratado con LA comparado con el grupo no tratado y el control en el grupo tratado ($p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente).

El recuento de células ED1 nos indica, por otro lado, la cantidad de células de microglía activa/macrófago dentro del biomaterial (Figura 36.C). Encontramos pues, un aumento muy significativo de la densidad de estas células en ambos grupos experimentales tanto a los 15 como a los 60 días ($p < 0.001$), y a su vez, un aumento estadísticamente significativo en los animales no

tratados con LA comparado con los tratados ($p < 0.01$). Por otro lado, el porcentaje de células ED1 positivas (Figura 36.D), también mostró un aumento estadísticamente significativo en todos los grupos experimentales respecto al control ($p < 0.001$).

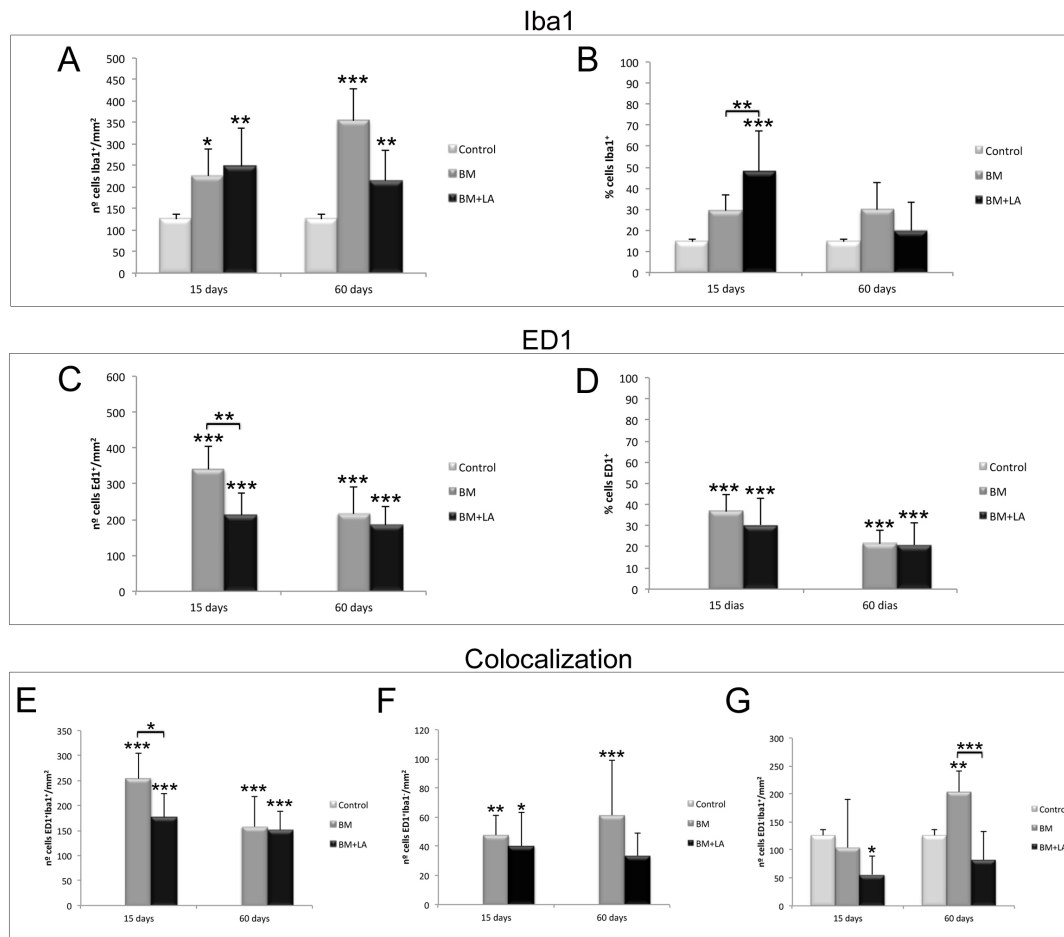


Figura 36. Las gráficas representan la densidad de células Iba1 (n° células Iba1/mm²) (A), el porcentaje de células Iba1 (B), la densidad de células ED1 (C), el porcentaje de células ED1, la densidad de células ED1 e Iba1 que colocalizan (E), la densidad de células solo Iba1 positivas (F) y la densidad de células sólo ED1 positivas (G). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Al mismo tiempo se realizaron colocalizaciones entre ambos marcadores (Figura 36.E), encontrando otra vez, un aumento muy significativo del número de células que expresaban ambos marcadores en todos los grupos experimentales ($p < 0.001$), por lo que estas células de microglía presentaban también capacidad de microglía activa/macrófaga. Sin embargo, al igual que en el caso anterior, este número fue estadísticamente superior a los 15 días en los animales no tratados comparado con los tratados ($p < 0.05$).

Por otro lado, se calculó el número de células que tan sólo expresaban uno de los dos marcadores. En el caso de ED1 (Figura 36.F), encontramos que había un aumento estadísticamente significativo de estas células en todos los grupos experimentales respecto al control, excepto en los animales tratados con LA a los 60 días. Por otro lado, las células que tan solo expresaban el marcador Iba1 (Figura 36.G), no mostraban grandes diferencias a los 15 días, pero sí a los 60 días, donde existía un aumento estadísticamente significativo de estas células en los animales no tratados con LA comparado con el control ($p < 0.01$) y con las tratados con LA ($p < 0.001$).

2.5. Estudio del crecimiento neuronal

Por supuesto, aunque el resto de tipos celulares son importantes para el sostén y el correcto funcionamiento del tejido, la célula por excelencia del tejido nervioso es la neurona, unidad funcional de CNS. Un estudio preliminar del BM a los 15 días mostró que, la cantidad de neuronas existentes dentro del biomaterial era considerablemente baja para poder realizar el estudio, por lo que los datos e imágenes que se muestran a continuación son los relativos a los 60 días.

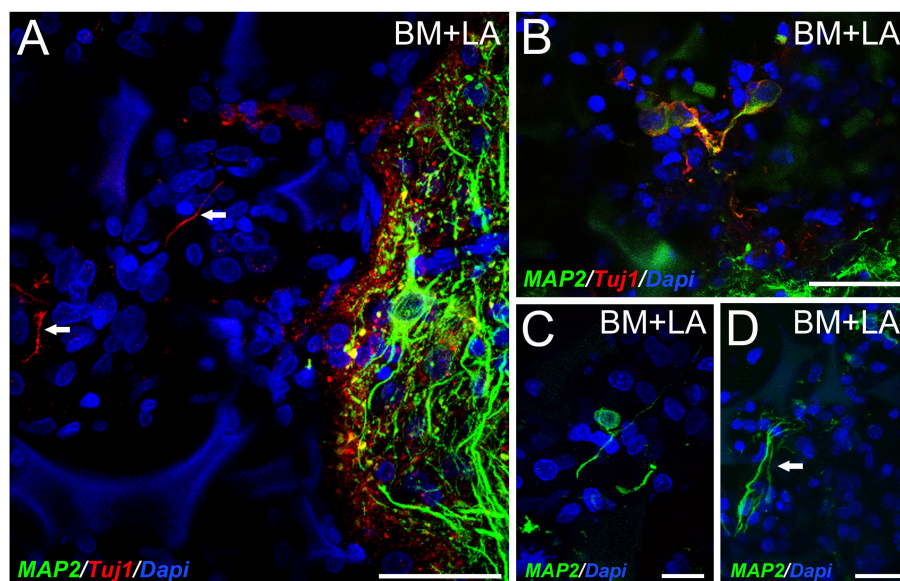


Figura 37. Inmunofluorescencia para Tuj1 (neuronas inmaduras) en rojo y MAP2 (neuronas maduras) en verde en los animales tratados con ácido lipoico a los 60 días (A y B), los núcleos aparecen marcados con Dapi en azul. Inmunofluorescencia para MAP2 en los animales tratados (C y D). Las flechas blancas indican los axones dentro del biomaterial. Barras de escala: 100 μm en A y B; 50 μm en C; 25 μm en D.

A este tiempo encontramos algunas terminaciones nerviosas de neuronas jóvenes (Tuj1⁺) que se adentran en el biomaterial (Figura 37.A). Además encontramos que algunas de estas neuronas empezaban a expresar marcadores de neuronas maduras (MAP2⁺) (Figura 37.B). Y en ocasiones, encontramos también neuronas totalmente maduras (expresando el marcador MAP2) dentro del biomaterial (Figura 37.C) que extendían sus terminaciones nerviosas dentro del biomaterial (Figura 37.D).

El recuento neuronal mostró que la densidad de neuronas inmaduras a los 60 días (Figura 38.A) era estadísticamente superior en los animales tratados con LA, comparado con los animales no tratados e incluso con el control ($p < 0.05$). Sin embargo, la densidad de neuronas maduras en estos animales era inferior que en los animales control ($p < 0.05$) pero, muy superior comparado con los animales no tratados ($p < 0.001$), los cuales presentaban una densidad neuronal mucho inferior que los animales control ($p < 0.001$).

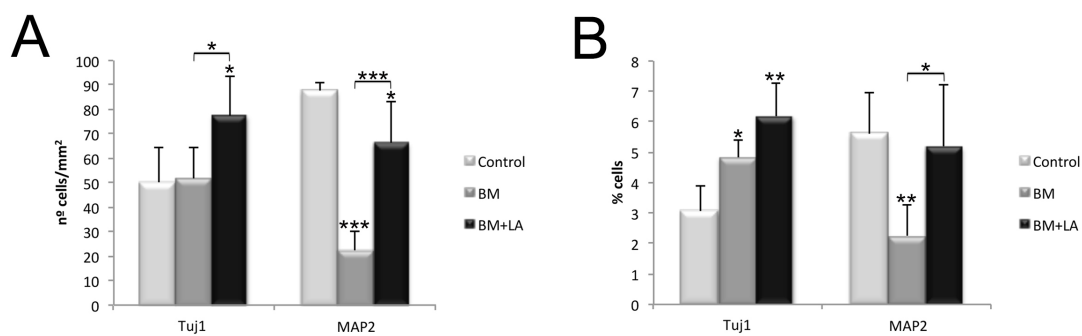


Figura 38. Cuantificación de la densidad de células (n° cells/mm²) MAP⁺ y Tuj1⁺ (A) y porcentaje de cada tipo celular (B) en cada uno de los grupos. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Por otra parte, se calculó el porcentaje de células pertenecientes a cada tipo celular (Figura 38.B). Encontrando un aumento estadísticamente significativo en el número de neuronas jóvenes entre los grupos experimentales y el control ($p < 0.05$ en CR y $p < 0.01$ en CR+LA). Asimismo, encontramos que el porcentaje de neuronas maduras en los animales no tratados con LA era estadísticamente inferior ($p < 0.01$) comparado con el control e incluso con los animales tratados con LA ($p < 0.05$), en los que no encontramos diferencias con el control.

2.6. Estudio mediante resonancia magnética

2.6.1. Estudio estructural

En este estudio, se realizaron escáneres estructurales T2 de los animales (Figura 39.A y 39.B) a los 2 y 6 meses posteriores a la lesión. En las imágenes T2 la parte grasa del cerebro aparece en color oscuro y la parte líquida de color blanco. Esto nos proporciona información sobre posibles procesos patológicos en el cerebro o el grado de recuperación de un tejido dañado.

Los resultados obtenidos de los valores de grises mostraron que, a los dos meses existía una disminución estadísticamente significativa en los valores de gris en ambos grupos experimentales respecto al control ($p < 0.001$) (Figura 39.C).

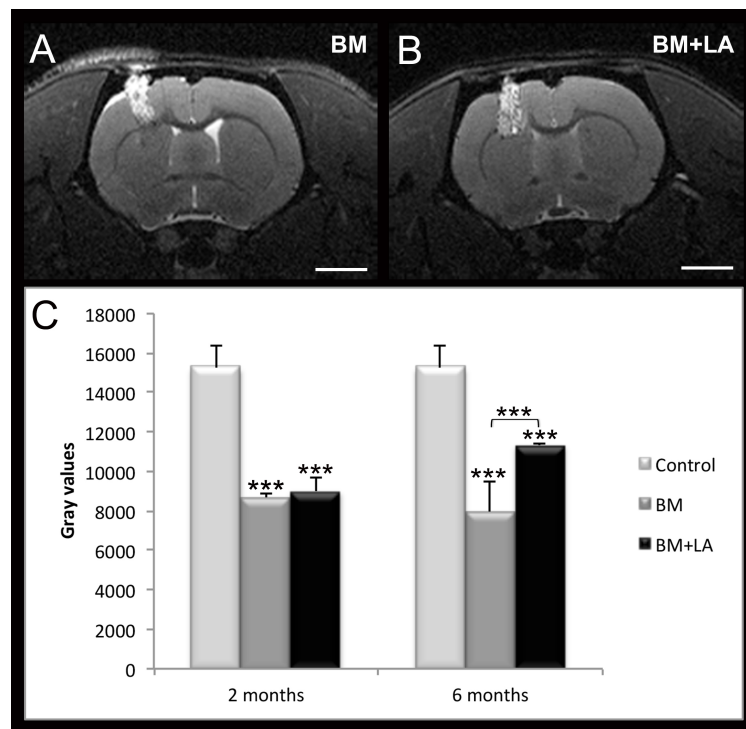


Figura 39. Imágenes del escáner T2*-weight de un animal no tratado (A) y uno tratado con LA (B) a los 6 meses. Cuantificación en valores de grises del tejido del interior del biomaterial en ambos grupos experimentales a los 2 y 6 meses (C). *** $p < 0.001$.

Sin embargo, a los 6 meses encontramos que, el grupo tratado con LA presentaba un aumento estadísticamente significativo en los valores de grises comparado con el grupo no tratado y con el control ($p < 0.001$).

2.6.2. Estudio funcional

Para evaluar la presencia de funcionalidad dentro del biomaterial, se realizó el estudio mediante resonancia magnética funcional (fMRI). Los pixeles en rojo representan zonas de activación.

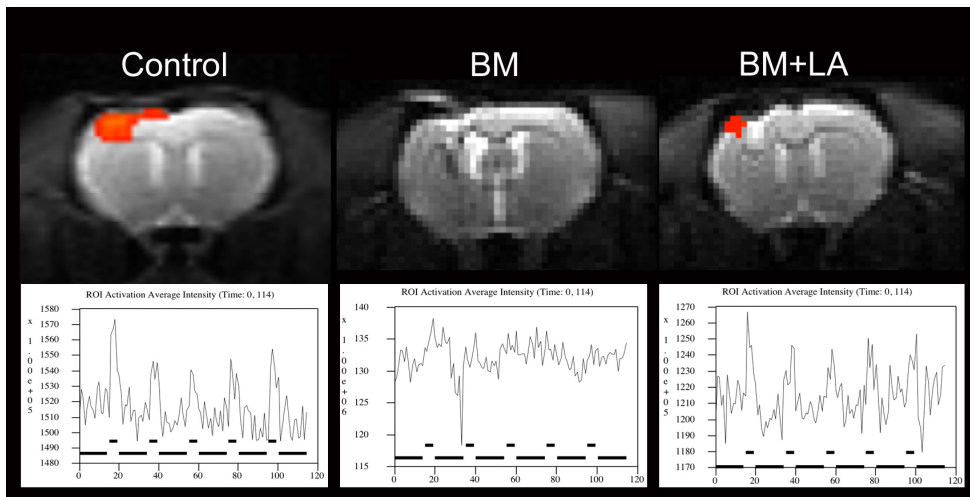


Figura 39. Imágenes de los escáneres fMRI (arriba) y su correspondiente perfil de activación (abajo). Los pixeles en rojo significa señal BOLD positiva.

Los resultados mostraron que no había activación dentro del biomaterial en ninguno de los animales, ya fueran tratados o no tratados, a ningún tiempo. Sin embargo, se pudo detectar señal BOLD (activación) al lado del biomaterial en el 50% de los animales tratados con LA y en el 33% de los animales no tratados (Figura 40 arriba). Las gráficas representan los perfiles de activación de los diferentes grupos (Figura 40 abajo). En gran parte de los animales tratados con LA encontramos una correcta activación del área somatosensorial, en cambio, en muchos de los animales no tratados encontramos que no había ningún tipo de activación de dicha zona.

DISCUSIÓN

La TBI está considerada como una de las mayores causas de muerte y discapacidad en todo el mundo (Maegerle and Schaefer, 2008). Un importante número de pacientes con TBI sobreviven con importantes daños cerebrales y déficit de comportamiento, incluso después de una lesión leve o moderada (Jennett, 1972, Harrahill, 1997, Sharp et al., 2011).

El TBI implica, por lo general, la disrupción de la barrera hematoencefálica (BBB), falta de energía, excitotoxicidad y liberación de radicales libres, lo cual conlleva a la necrosis isquémica o apoptosis (Dirnagl et al., 1999, Del Rio et al., 2011). El LA es un cofactor natural que ha sido recientemente estudiado en modelos animales de TBI (Gonzalez-Perez et al., 2002, Schreibelt et al., 2006, Toklu et al., 2009). Estudios recientes demuestran su papel neuroprotector al actuar como un antioxidante y agente anti-inflamatorio (Freitas, 2009, Toklu et al., 2009, Rochette et al., 2013), siendo capaz de cambiar la regulación de varios genes asociados con la supervivencia celular, la inflamación y estrés oxidativo (Larghero et al., 2007).

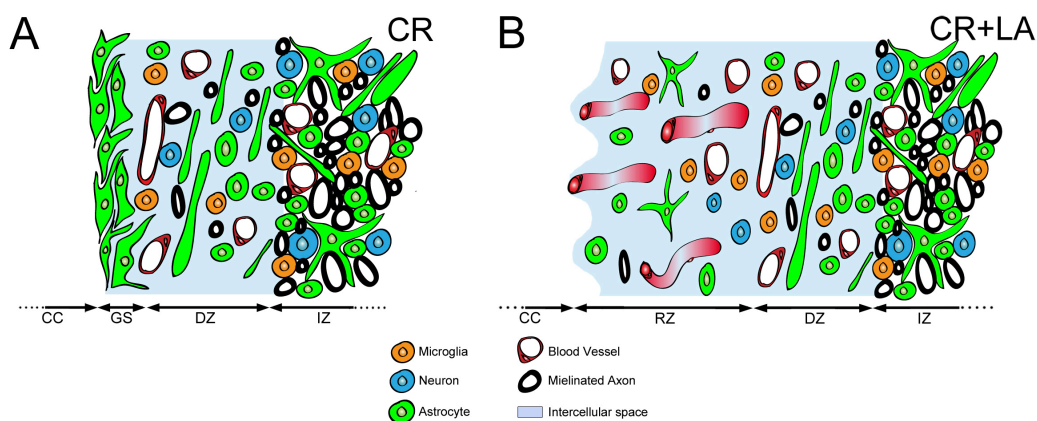


Figura 41. Ilustración que representa la zona lesionada de los animales no tratados (A) y los animales tratados (B). CC: cavidad cística; GS: cicatriz glial; DZ: zona de degeneración; IZ: zona intacta; RZ: zona de regeneración.

Una de las conclusiones más destacables en este trabajo es la descripción de las tres zonas alrededor de la zona lesionada 15 días después de la lesión. Cuando se produce una lesión cerebral con pérdida de masa encefálica, la regeneración espontánea es imposible debido a su propio entorno inhibitorio, que incluye la formación de la cicatriz glial (Schmidt and Leach, 2003, An et al., 2006, Rocamonde et al., 2012). La primera zona a describir está delimitada por una cicatriz glial (GS) que rodea a la cavidad cística central (CC). Seguido de una segunda zona de degeneración (DZ), en la que el tejido se ha visto afectado por procesos de muerte celular, y finalmente, una tercera zona no afectada nombrada como zona intacta (IZ) como parte del parénquima neural (Figura 41.A). Sin embargo, el tratamiento con LA durante 7 días sucesivos a la lesión, disminuyó significativamente la GS. En su lugar, se observó una continuidad de tejido neural nombrado en este documento como zona de regeneración (RZ), caracterizado por la

presencia de varios vasos sanguíneos que se abren paso a través de esta zona. Esta RZ se expande dentro de la CC, donde se encontraron grandes espacios intercelulares y algunas células gliales y neuronas con terminaciones sinápticas llenando la CC. Este hecho podría ser razonablemente interpretado como un proceso de renovación, con muerte celular y proliferación (Figura 41.B).

Por otra parte, se ha observado que, después de una lesión cerebral, un gran número de células mueren. Debido a esta muerte, muchas sustancias neurotóxicas se liberan al medio extracelular, promoviendo un aumento de ROS y la activación de procesos de apoptosis/necrosis (Kaur and Ling, 2008) y disminuyen los niveles de GSH. Muchos estudios han dado a conocer las propiedades antioxidantes del LA después de un trauma cerebral (Packer et al., 1997, Lynch, 2001), aumentando la producción de GSH (Packer et al., 1995) y la recuperación de la BBB. En este estudio, se ha observado un incremento de la capacidad antioxidante total en el área lesionada después de 7 días de tratamiento, lo que indica que el LA era capaz de atravesar la BBB (Shay et al., 2009) y actuar como un antioxidante en el cerebro (Annahazi et al., 2007).

Por otra parte, el LA, no sólo promovió sobre la recuperación de los niveles de GSH, sino que también estimuló la síntesis de GSH de *novο*, lo que disminuye la formación de ROS después de una lesión cerebral (Packer et al., 1997, Toklu et al., 2009). Es bien conocido que una disminución de ROS promueve la supervivencia celular (Silva and Coultinho, 2010). Estudios recientes sugieren que LA funciona como un buen neuroprotector al actuar como un agente antioxidante y anti-inflamatorio (Freitas, 2009, Toklu et al., 2009), siendo capaz de cambiar la regulación de varios genes asociados con la supervivencia celular, la inflamación y estrés oxidativo (Larghero et al., 2007). Además, nuestros datos actuales coinciden con estudios previos sobre el tema (Freitas, 2009, Toklu et al., 2009, Rocamonde et al., 2012). Con esto, se demuestra que un tratamiento con LA durante 7 días es capaz de disminuir el estrés oxidativo del entorno y promover la supervivencia celular en el área lesionada después de 15 días.

Numerosos estudios demuestran que, tras una lesión en el CNS, se activa la proliferación de células en la zona subventricular (SVZ) y la posterior migración de estas células recién nacidas a la zona lesionada (Panigrahi et al., 1996, Yamashita et al., 2006, Kojima et al., 2010). En nuestro trabajo hemos mostrado evidencias de proliferación tras la lesión. En este aspecto, cabe destacar la obtención de dos conclusiones razonables. La primera de ellas es el hecho que el LA aumenta la proliferación y/o migración de células en la zona lesionada. La segunda se basa en la distribución de estas células en esta zona. Cuando aplicamos el tratamiento con LA, hemos podido observar que estas nuevas células se distribuyen de manera aleatoria en la zona colindante a la lesión, mientras que la ausencia de tratamiento lleva a estas células a distribuirse a lo largo del límite de la lesión.

Además, hemos podido observar que muchas de estas células de nueva formación corresponden a células endoteliales y astrocitos en los animales tratados con LA. Por otro lado, también hemos observado que, la ausencia de tratamiento, lleva inevitablemente a la formación de una cicatriz glial y distribución de estos astrocitos a lo largo del límite de la lesión, formando una

barrera física que impediría la regeneración de la lesión. Este patrón de distribución corresponde con el descrito por las células de nueva formación, por lo que es razonable pensar que se trata de las mismas células.

Los astrocitos desempeñan un papel activo en el mantenimiento de la estructura, el metabolismo y la función del cerebro (Barcia et al., 2008). En respuesta a diversas lesiones cerebrales los astrocitos se vuelven hipertróficos; tales astrocitos son también conocidos como los astrocitos reactivos y/o activados (Bushong et al., 2004, Wilhelmsson et al., 2006, Chvatal et al., 2007). Los astrocitos reactivos se reconocen a través de su aumento en el tamaño y la regulación de la proteína GFAP (Faulkner et al., 2004, Das et al., 2012). En este sentido, el tratamiento LA no mostró diferencias en el número de astrocitos, pero sí lo hizo en el tamaño, mostrando una reducción de la superficie ocupada por estas células gliales. La reducción de la cicatriz glial permite posiblemente la llegada de las células microgliales implicadas en procesos de remodelación.

Por otro lado, recientes estudios revelaron que los astrocitos, guiados por VEGF, juegan un papel crucial en la formación y el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (Bozoyan et al., 2012). En este trabajo se han observado que nuevos astrocitos comparten el espacio cerca de la zona de lesión con nuevos vasos sanguíneos. Además, se ha demostrado que la administración de LA promueve la formación de vasos sanguíneos y que, además, estos se distribuyen de forma perpendicular a la lesión, hecho que probablemente mejore la reperfusión y el aporte de oxígeno y nutrientes en la zona colindante a la lesión.

Recientemente, se ha estudiado algunas sustancias con capacidad antioxidante tal como resveratrol, un estilbeno natural presente en las uvas, demostrando que su administración mejora el resultado frente al TBI probablemente mediante la regulación de la óxido nítrico sintetasa y VEGF (Tsai et al., 2007, Dong et al., 2008, Rochette et al., 2013). En nuestro estudio, se ha observado que el LA es capaz de estimular la angiogénesis después de la lesión cerebral, además, al bloquear VEGF, por la administración de bevacizumab, hemos podido demostrar que el LA es capaz de estimular la angiogénesis por sí mismo.

Por otro lado, la barrera hematoencefálica es una membrana protectora que restringe la entrada de moléculas y células blancas de la sangre de la circulación sistémica al CNS. Entre sus funciones está la de mantener el balance homeostático del fluido extracelular cerebral (Pun et al., 2009). Se sabe que estas ROS están aumentadas en las lesiones cerebrales y que contribuyen a un aumento de la permeabilidad de la BBB (Olensa et al., 1987). También es conocido que los antioxidantes, tales como el LA, ayudan a reducir la permeabilidad de la BBB y por lo tanto el daño celular, mientras se mantiene el equilibrio iónico de Ca^{2+} y Mg^{2+} en las células endoteliales del cerebro (Li et al., 2000, Rochette et al., 2013). Respecto a esto hemos observado que, el LA promueve el aumento del número de contactos entre astrocitos y vasos sanguíneos, pero no se han observado diferencias en la longitud de los contactos. Estos hechos están en concordancia con el efecto del LA estudiado previamente en modelos animales de TBI y en accidente cerebrovascular, mostrando una restauración de la disrupción de la BBB y la normalización de los

niveles de activación astrogliales y de GSH (Gonzalez-Perez et al., 2002, Schreibelt et al., 2006, Toklu et al., 2009).

Hay crecientes evidencias de que la respuesta inflamatoria en los troncos nerviosos es importante para la regeneración axonal (Barrette et al., 2008). Y también es bien sabido que la presencia de microglía estimula las neuronas lesionadas para regenerar sus axones (Lu and Richardson, 1991, Leon et al., 2000). La función de la microglía en reposo en condiciones normales no está clara. En condiciones patológicas, la microglía se activa rápidamente y se expande en la población para responder a la lesión o estímulo. Algunos autores han argumentado que la distribución de la microglía en el cerebro permite "sentir" su entorno inmediato, por lo que las células individuales podrían responder a las señales químicas o mecánicas para activar la respuesta a la lesión (van Rossum and Hanisch, 2004). En este trabajo, hemos observado que la administración de LA produce una activación de las células de microglía a los 15 días. Como hemos mencionado anteriormente, el LA evita la formación de la cicatriz glial y promueve la formación de vasos sanguíneos, es razonable hipotetizar que estos procesos hacen posible el acceso a estas células de microglía con capacidad macrófaga para la eliminación de desechos y la remodelación de la zona lesionada (Stoll and Jander, 1999), procesos que no serían posibles en ausencia del tratamiento.

El BDNF es un factor trófico que desempeña un papel importante en el CNS como un agente neuroprotector (Schabitz et al., 1997, Wu, 2005) esencial para la estimulación de la plasticidad cerebral (Bessis et al., 2007, Schabitz et al., 2007, Mattson, 2008). El importante papel de la microglía en la estimulación de la neuroplasticidad cerebral puede ser debido a la producción de BDNF, que se ha relacionado con en el aprendizaje y la memoria (Binder and Scharfman, 2004, Lipsky and Marini, 2007, Xia et al., 2010). Por lo tanto, se cree que el BDNF promueve la supervivencia de las neuronas jóvenes que se originaron en la SVZ (Pencea et al., 2001) y desempeña un papel como un factor trófico para las neuronas que han madurado y se están integrando a circuitos funcionales (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). Además, se sabe que pCREB está implicado en la vía de activación de BDNF. En este estudio, se muestra un incremento de ambas proteínas después del tratamiento con LA. Estos datos sugieren que el LA podría estar implicado en la estimulación de las proteínas pCREB y BDNF, proteínas relacionadas con la supervivencia y maduración de las neuronas (Pencea et al., 2001, Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002).

En vista de estos resultados, se puede decir que, la administración de LA es capaz de aumentar la capacidad antioxidante del medio ambiente, reducir la cicatriz glial, estimular la angiogénesis y promover la regeneración del tejido neural. Como consecuencia, el tejido neural crece hacia la cavidad cística, se producen nuevas células y se reorganizan, reduciendo así el daño del tejido (Fitch et al., 1999, Rocamonde et al., 2012). Sin embargo no sabemos cuánto tiempo sería necesario para una completa recuperación de la lesión o incluso si sería posible. Por ello proponemos una segunda estrategia, como es el uso de biomateriales como andamio para ese fin.

Previamente se ha estudiado que, la colocación de un *scaffold* en el área dañada o cavidad puede proporcionar soporte para el tejido cerebral circundante, funcionando como sustrato para el crecimiento celular, la regeneración de axones y para la formación de neuritas (Tsai et al., 2004, Veiga et al., 2011, Martinez-Ramos et al., 2012).

Las estrategias estudiadas tiempo atrás en la regeneración de las lesiones en el PNS y el CNS no han tenido mucho éxito debido a la falta de conocimientos sobre los mecanismos de lesión en ambos sistemas (An et al., 2006, Das et al., 2012). Además, el tamaño de la lesión es un factor limitante muy importante en el proceso de regeneración (Papadopoulos et al., 2002). Para superar este problema y favorecen la regeneración de tejido neural después de una lesión, se han dedicado muchos esfuerzos a investigar el uso de diferentes tipos de *scaffolds* poliméricos en el cerebro (Martinez-Ramos et al., 2012). Los biomateriales poliméricos son ampliamente preferidos como andamios para la regeneración del PNS y CNS, tanto *in vivo* como *in vitro* (Subramanian et al., 2009, Veiga et al., 2011, Sur et al., 2012, Zhang et al., 2013). Los *scaffolds* hechos de ácido hialurónico, poli (epsilon-caprolactona), poli (ácido glicólico) o polydimethylxilosane se han empleado en los modelos animales de lesión cortical (Hou et al., 2005, Zhang et al., 2013). Un biomaterial adecuado para la ingeniería de tejidos en el cerebro debe soportar el crecimiento celular, debe ser altamente poroso debido a que soporta mayor número de células y ser compatible con el tejido del huésped (Woerly et al., 1999, Tian et al., 2005). Además debe permitir una distribución uniforme de las células, así como la difusión de oxígeno y nutrientes de los tejidos del huésped, y debe permitir la neovascularización para favorecer la supervivencia de las células del interior (Martinez-Ramos et al., 2012).

En la segunda parte de nuestro estudio, disponíamos de un biomaterial polimérico compuesto por p(EA-co-HEA) en una proporción 90/10, que fue implantado satisfactoriamente cerca de la SVZ y no sufrió ningún tipo de rechazo por parte del animal (Martinez-Ramos et al., 2012). Además, el implante del biomaterial en combinación con el tratamiento con LA durante 7 días fue capaz de promover la colonización del biomaterial por un gran número de células neurales.

El principal requisito que se deben dar en un tejido para poder regenerado, es sin duda, el aporte de oxígeno y nutrientes que viene dado por los vasos sanguíneos (Brown et al., 1985, Morgan et al., 2007). En nuestro estudio encontramos que el biomaterial proporciona un buen ambiente para el crecimiento de vasos sanguíneos dentro del mismo. Se ha podido observar que los vasos sanguíneos juegan un papel importante como guías de migración de las células neurales desde la SVZ hacia la zona lesionada (Kojima et al., 2010).

Por otro lado, otro tipo celular importante para la formación del nuevo tejido son los astrocitos, que establecen relación con los vasos sanguíneos y proporcionan un soporte a las células, y por otro lado, participan en la respuesta a la inflamación (Rohl et al., 2010). En nuestro estudio la respuesta astrogliar sufrió un aumento significativo inicialmente en los animales tratados con LA, pero esta disminuyó posteriormente. En cambio en los animales no tratados el aumento de la respuesta astrogliar se dio tardíamente. Recientemente se ha podido observar que, después

de un trauma, los astrocitos liberan factores tróficos que estimulan la activación microglial, el mecanismo de reparación y promueven el crecimiento de nuevas neuritas (Wang et al., 2007, Loov et al., 2012). Por otra parte, los astrocitos suministran nutrientes al NS, tales como glucógeno y realizan la glucogenólisis inducida por norepinefrina. Esta función es muy importante debido a que las neuronas no son capaces de restaurar moléculas energéticas (Lucas et al., 2006).

Aunque en la actualidad existe una cuestión abierta sobre el papel de las células microgliales, también hay evidencias crecientes que muestran que, bajo ciertas circunstancias, la microglía podría tener un papel neuroprotector (Neumann et al., 2006, Lalancette-Hebert M et al., 2007) y promover la neurogénesis adulta (Kim et al., 2009, Thored et al., 2009). Nuestros estudios revelan que, se produce una activación temprana de las células de microglía en ausencia de LA. Además, hemos observado que tras la lesión, se produce inicialmente una infiltración de macrófagos de la sangre, que se ve aumentada en ausencia de LA. En este sentido, algunos autores han observado la infiltración de macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares de la sangre tras un daño cerebral (Neumann, 2006); sin embargo, desconocemos los efectos de estas células en la participación de la regeneración de la lesión.

Hemos podido observar que el tratamiento con LA estimula la proliferación y migración al biomaterial de un gran número de neuronas inmaduras (Tuj1). Así mismo también encontramos algunas neuronas maduras (MAP2) dentro del biomaterial con procesos sinápticos. Recientes estudios en este tipo de biomateriales mostraron un buen rendimiento de los mismos como soporte de para células madre. Se observó que un gran número de estas células eran capaces de sobrevivir y diferenciarse tanto en células gliales como en neuronas con extensiones dendríticas (Veiga et al., 2011, Martínez-Ramos et al., 2012). A pesar de que encontramos algunas neuronas maduras dentro del biomaterial, no pudimos observar ningún tipo de activación mediante fMRI, esto probablemente sea debido a que el número de neuronas no era suficientemente elevado y que estas aun no habían sido capaces de establecer las conexiones necesarias para la activación. Pero los escáneres estructurales nos mostraron que, trascurridos 2 meses tras la lesión, existía un aumento en la cantidad de líquido dentro del biomaterial, indicada por unos valores bajos en el escáner T2. Sin embargo, a los 6 meses, pudimos observar que el grupo tratado con LA presentaba una disminución en la cantidad de líquido dentro del biomaterial (incremento en los niveles de gris), esto nos indica que hubo cierta recuperación del tejido presente dentro del biomaterial.

Con estos datos, podemos concluir que, el uso de biomateriales poliméricos formados por p(EA-co-HEA) 90/10 proporcionan un buen soporte para la regeneración del tejido lesionado. Así mismo, el uso combinado del tratamiento con LA y el biomaterial parece favorecer en cierto grado la migración de neuronas maduras. No sabemos si estas neuronas en un futuro serán capaces de reconstruir completamente la arquitectura de la corteza cerebral y mucho menos si conseguirán reconectar el circuito.

Los tratamientos para las enfermedades cerebrales y degenerativas tradicionalmente han tenido un éxito limitado fuera de unos pocos agentes farmacológicos capaces de modificar síntomas de la enfermedad. Hoy en día, sin embargo, los avances en la administración de

fármacos y la ingeniería de tejidos se están abriendo posibilidades, que se extienden más allá del alivio sintomático, para incluir la neuroprotección y neuroreparación. Además, los biomateriales se están utilizando cada vez más para promover la regeneración endógena. El éxito del desarrollo de biomateriales eficaces en la protección cerebral, reparación o regeneración requerirá de una interacción compleja entre investigadores y clínicos de disciplinas dispares. La principal razón de esto radica en la complejidad del propio cerebro y la miríada de respuestas celulares bioquímicas asociadas con la lesión y la reparación (Orive et al., 2009). Como tal, el desarrollo y diseño racional de los biomateriales para la reparación del cerebro requerirá avances significativos en esta campo, junto con una mejor comprensión de los tipos de lesiones cerebrales y un mejor conocimiento sobre las respuestas biológicas frente a los TBI.

CONCLUDING REMARKS

1. Lipoic acid administered after brain injury, increase the antioxidant capacity of the tissue and normalizes the GSH levels.

2. Lipoic acid promotes cell survival and proliferation in the injured area and these newborn cells become astrocytes and endothelial cells.

3. The administration of lipoic acid avoid the glia scar formation and decreases the astroglial reactivity in size but not in number.

4. Lipoic acid promotes angiogenesis after brain injury even by itself when VEGF is blocked.

5. Lipoic acid is able to activate microglial cells and upregulate pCREB and BDNF, which are related with plasticity.

6. The combination of lipoic acid treatment with a p(EA-co-HEA) biomaterial increases the number of cells migrating, colonizing and growing inside the scaffold.

7. Lipoic acid promotes the formation of blood vessels as well as astrocytes whereas it decreases the number of active macrophages inside the biomaterial.

8. Lipoic acid promotes neuron migration, maturation and neural processes growing inside the biomaterial.

EXTENDED SUMMARY

1. Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is the leading cause of death and disability worldwide (Maegele and Schaefer, 2008). A significant number of patients with TBI survive with significant brain damage and behavioural impairment, even after mild or moderate head injury (Jennett, 1972, Harrahill, 1997, Kumar et al., 2013, Muehlschlegel et al., 2013).

Acute central nervous system (CNS) injury, such as mechanical trauma, stroke, or subarachnoid haemorrhage, usually involves pathological permeability of blood brain barrier (BBB), energy failure, ion homeostasis misbalance, acidosis, increased intracellular calcium, excitotoxicity, and free radical-mediated toxicity leading to ischemic necrosis or apoptosis (Pulsinelli, 1992, Gennarelli, 1997, Dirnagl et al., 1999). Reactive oxygen species (ROS) have been pointed out as possible candidates for the elicitation of the deleterious phenomena occurring after TBI and ischemia (Demopoulos et al., 1980, Hall and Braugher, 1989, Siesjo et al., 1989, Yukido and Long, 1990, Helfaer et al., 1994, Kaur and Ling, 2008, Xia et al., 2010). The brain is the organ with highest oxygen requirement in the body and therefore with very high oxidative metabolic activity, intensive production of ROS, and with low antioxidant capacity (Evans, 1993). Nervous tissue is rich in polyunsaturated fatty acids, mainly located in the myelinated axons and the plasmatic membrane, and ROS can easily react with these molecules producing different products such as aldehydes, e.g malondialdehyde, this process is known as "lipid peroxidation" (Watson, 1993).

Glutathione is the most abundant non-protein thiol found in the brain. The reduced glutathione form (GSH) serves as a substrate for the enzymatic reduction of peroxides via glutathione peroxidase being transformed to its oxidized form. The relevance of the oxidative misbalance after TBI or other neuropathologies seems to be closely related to the BBB integrity and infiltrative processes. In this sense, cellular permeability impairment seems to be secondary to oxidative stress (Gursoy-Ozdemir et al., 2004, Parathath et al., 2006). Some studies have been targeting on the oxidative misbalance and antioxidant therapies in experimental models of stroke or TBI revealing interesting findings. The administration of S-nitrosoglutathione, a potent antioxidant originated from GSH and Nitric Oxide (Rauhala et al., 1998) restored BBB disruption after TBI (Khan et al., 2009).

The use of lipoic acid (LA) on TBI and stroke animal models seems to be effective restoring BBB disruption and normalizing the astrocytic/microglial activation and GSH levels (Gonzalez-Perez et al., 2002, Schreibelt et al., 2006, Toklu et al., 2009, Rochette et al., 2013). Cellular oxidative stress and energy failure are involved in Glutamate neurotoxicity, whereas, acetyl-L-carnitine and LA are known to be key players in the mitochondrial energy production (Babu et al., 2010). It is known that LA is a natural cofactor for mitochondrial enzymes and is critical in breaking down fatty acids, which further enhance cellular energy efficiency. Recent studies suggest that LA works as a good neuroprotectant by acting as an antioxidant and anti-inflammatory agent (Freitas, 2009, Toklu et al., 2009), and is able to switch the regulation of several genes linked to cell survival, inflammation and oxidative stress (Larghero et al., 2007, Rochette et al., 2013).

Although little is known about the effects of the antioxidants on the neovascularization processes after TBI, some data on ischemia–reperfusion models have been reported. The administration of Resveratrol, a natural stilbene present in grapes, improved the TBI outcome probably by regulating VEGF and nitric oxide synthase (Tsai et al., 2007, Dong et al., 2008) whereas it reduced the metalloprotease-9 levels and decreased oxidative stress values (Sinha et al., 2002, Gao et al., 2006).

The expression of various growth factors such as brain derived neurotrophic factor (BDNF) or VEGF can determine the size of neuronal or glial populations in both developing and in adult brain (Kuhn et al., 1997, Pencea et al., 2001). These factors are over expressed in some neurodegenerative models, where they act as protective factors in nerve damage or as inducing factors for the generation and differentiation of new cells to replace damaged ones (Kuhn et al., 1997, Aberg et al., 2000, Kuhn et al., 2001, Pencea et al., 2001). Furthermore, it is known that BDNF is necessary to maintain the hippocampal neurogenesis rate in adult mice (Lee et al., 2002, Suri et al., 2012).

To summarize, three important hotspots are implicated in the evolution of the injured area after TBI, leading to cell death or survival: i) Neovascularization, ii) Redox milieu, and iii) Glial reactivity. Therefore, these three hits are important targets to address new pharmacological strategies with clinical interest for the positive outcome of neural diseases, brain traumatic injuries and stroke.

The prevalence of lesions of the nervous system and the devastating consequences for patients who suffer urged finding an experimental strategy that allows injured axons grow within the CNS. Thus, the results obtained in laboratory animals can help people find a therapy.

Although closely approximate, experimental strategies used do not cover all requirements for regeneration, but all focused on the same basic idea: promote survival of injured neurons and axons provide the factors and the right environment for them to grow and be functional. Most of these techniques have been able to increase the survival of damaged neurons and they grow their axons within the implanted permissive multiple environments. Thus, in the field of tissue engineering is producing a growing interest in designing new biomaterials compatible with the nervous system.

At present, the use of biomaterials regenerative purposes is widespread in the field of biomedicine. The application of natural and synthetic polymers has been widely used in cases such as wound healing, drug delivery systems, vascular grafts or tissue reconstruction (Ito et al., 2005, Saracino et al., 2013). However, the design and evaluation of new biomaterials for neuroregenerative strategies is something that requires special attention given the complexity of the nervous system, as it has a limited regenerative capacity in response to injury.

In recent years, we have used different biogenic matrices in order to create a favourable environment for the regeneration of the nervous system. The fibronectin or collagen matrices have been shown to favour regeneration processes and peripheral nerve reconstruction (Ejim et al., 1993, Brown et al., 1994, Keilhoff et al., 2003, Zhang et al., 2013).

Another possibility for nerve regeneration is the use of synthetic biomaterials that promote axonal growth. Thus, polyglycolic acid filaments combined with laminin (LN) or collagen and synthetic materials based on poly (glycerol sebacate) are tested as substrates to support axonal growth with reduced scarring (Toba et al., 2001, Sundback et al., 2005, Martinez-Ramos et al., 2008) experiences with other materials has been reviewed recently. However, as mentioned previously, when it comes to establishing linking bridges long distances (> 10 mm) were obtained satisfactory results when very few have been used for this biocompatible materials (Hashimoto et al., 2002, Saracino et al., 2013).

Following a criterion based on the parallel study *in vivo* and *in vitro*, polymeric materials formed by ethyl acrylate (EA) and hydroxy ethyl acrylate (HEA) have been studied recently neuroregenerative purposes with promising results (Soria et al., 2006, Campillo-Fernandez et al., 2007, Veiga et al., 2011).

On the other hand, a variety of techniques to conjugate growth factors to natural or synthetic biomaterials and chemicals have been developed. These immobilized factors will be available to cells that come in contact with the matrix, providing a highly localized signal to control cell fate (e.g. stem cell differentiation (Dawson et al., 2008, Lee et al., 2011). In addition, various biodegradable polymers such as poly(lactic acid), poly(lactic-co-glycolic acid), poly(butylcyanoacrylate), chitosan (CS), and polylysine have been exploited as brain-targeting drug-delivery systems (Gref et al., 2003, Xie et al., 2012).

However, there is still much to investigate the ability of these biomaterials for promoting regeneration and its effects on the nervous system. The scaffolds should also deliver appropriate cues for promoting nerve regeneration in a controlled, localized manner. Current treatment for TBI focuses on preserving the healthy tissue remaining after injury as opposed to attempting to regenerate damaged tissue. Replacing damaged tissue with scaffolds containing drugs could help promote regeneration and functional recovery (Willerth and Sakiyama-Elbert, 2007, Nitta and Numata, 2013).

With all that facts, in the present work, we try to approximate a treatment combining antioxidant effects of lipoic acid and biomaterial scaffolds to promote neuroprotection and regeneration of a brain injury model.

2. Experimental procedures

2.1. Experimental animal models

Adult male Wistar rats (Harlan, Italy) weighing 250 ± 25 g were housed (two rats per box) one week before starting the experiment. Rats were housed in controlled conditions of temperature (20°C) and humidity (60%), under constant light-dark cycles of 12 hours. Handling and care of animals were done according the *Real Decreto* 1201/05 and supervised and approved by the

Committee of Ethics and Experimental Procedures of the Universidad CEU-Cardenal Herrera. Unnecessary stress or pain was avoided as possible.

2.1.1. Surgery and brain cryo-injury

Rats were anesthetized with a mixture consisting of ketamine (12 mg/kg), acepromizine (0.4 mg/kg) and phentaniol (0.02 mg/kg) that was injected intraperitoneally (i.p.) and then placed in a stereotaxic frame. The dorsal part of the skull was exposed and a craniotomy was performed with a drill (2 mm \varnothing) on stereotaxic coordinates (Paxinos and Watson, 1986) antero-posterior: 0 mm from Bregma and lateral: 1.5 mm from medial line (Figure 1.A). The brain cryo-injury was performed following the protocol described by Quintana et al. (Quintana et al., 2007). Thus, the cryo-injury (1 mm deep) was performed in the cerebral cortex by using a stainless steel probe (1 mm \varnothing) previously frozen in liquid nitrogen (Figure 1.B). Finally, animal skin was sutured and a mixture of buprenorphine (0.015 mg/kg) and metamizol (20 mg/kg) was administered i.p. after surgery.

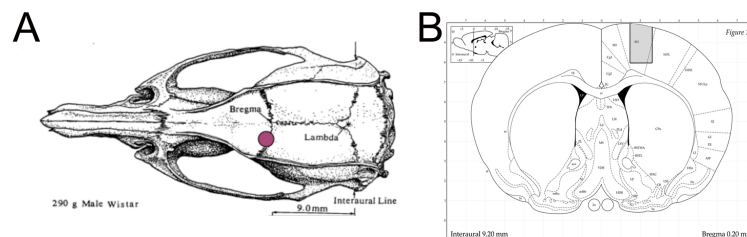


Figure 1. Dorsal view of a rat skull (Paxinos and Watson, 1986). Red point indicates the coordinates where the cryo-injury was done.

Another group of rats were anesthetized as described before but were not cryo-injured.

2.1.2. Implantation of the biomaterial

We performed the procedure described above to carry out the cryoinjury, but this time the lesion was at a depth of 4 mm. (Figure 2.A and 2.B). The biomaterials used are copolymers of polyethylacrylate grooved-hydroxyethylacrylate (p(EA-co-HEA)) in a ratio 90/10. The biomaterial implant (1 x 4 x 1) with the aid of microsurgical forceps in the injured area of the cerebral cortex (Figure 2.C and 2.D). After finishing the procedure the animals were sutured.

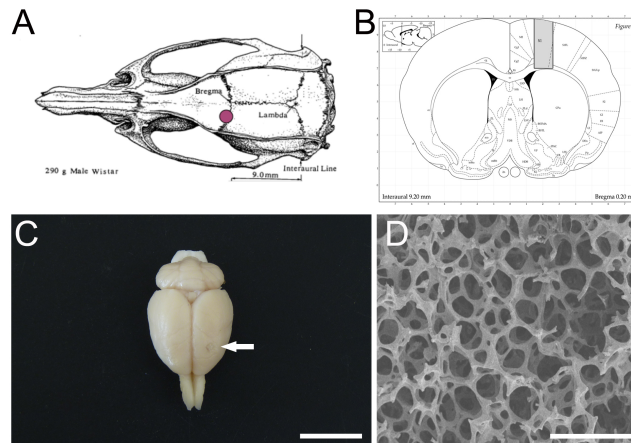


Figure 2. Dorsal sight of a rat skull. Red dot indicates the coordinates of the injury (A). Drawing of the place of injury and the biomaterial implant within the cerebral cortex (B). Picture of a brain attached to that has been implanted biomaterial (C). Implanted biomaterial, image taken by scanning electron microscopy (D). Scale bar: 10 mm in C and 200 μ m in D.

2.1.3. Experimental groups and lipoic acid administration

Cryo-injured rats were randomly selected immediately after surgery. One group (n=22) received daily LA 100 mg/kg i.p (Sigma Aldrich) for 7 days (CR+LA) starting the same day of surgery and the other group (n=22) received the same volume of saline (NaCl 0.9% i.p.) for the same period of time (CR). Non cryo-injured rats were divided in the same way: one group (n=18) received a daily dose of LA as described previously (LA) and the other group (n=18) received the same volume of saline (Control).

2.1.4. Anti-VEGF treatment

Bevacizumab (Avastin®, Roche), an anti-VEGF agent (Kobold et al., 2009) was administered in order to test if LA works on a VEGF dependent manner. Cryo-injury was also done as described previously in section 2.1.1. (*Surgery and brain cryo-injury*). Rats received one i.p. dose Bevacizumab (10 mg/kg) and were divided into two groups: one group (n=12) received a daily dose of LA (CR+AV+LA) for 7 days and the other group (n=12) received the same volume of saline (both i.p.) (CR+AV).

2.1.5. BrdU administration protocol

In order to study cell proliferation, 7 and 31 hours after the surgery, animals received an i.p. dose of Bromodeoxyuridine (BrdU) 100 mg/kg (Sigma Aldrich).

2.2. Sacrifice and tissue preparation

One pool of animals was housed for 7 days and then sacrificed by an i.p. overdose of Pentobarbital 0.2 g/kg in order to evaluate the antioxidant capacity of LA and GSH values in the brain tissue. Another pool of animals was housed for 15 days for the rest of studies and then sacrificed by an i.p. overdose of Pentobarbital 0.2 g/kg.

2.2.1. Samples for histology and immunocytochemical procedures

Once sacrificed, animals (n=6 for each group) were intracardially perfused with 100 mL of saline followed by 200 mL of 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer 0.01 M pH 7.2. Brains were removed and post fixed in the same fixative solution for 24 h at 4°C. Then, brains were cryoprotected by immersion in sucrose 30% in PB 0.01 M pH 7.1 solution for five days also at 4°C. Sections of 20 µm thick were serially obtained with a cryostat (Leica) and mounted in glass slides. Sections were stored at -80°C.

2.2.2. Samples for electron Microscopy

Part of the animals of the CR (n=4) and CR+LA (n=4) groups were perfused with 100 mL of saline 0.9% and 200 mL of 2% PFA + 2.5% glutaraldehyde for electron microscopy. Brains were post-fixed in the same fixative solution for 2 hours at 4°C. Brains were serially sectioned (200 µm) and stained for alkaline phosphatase. Sections containing alkaline phosphatase-positive cells were washed overnight in phosphate buffer saline (PBS) at 4°C, fixed in 1% osmium tetroxide (Electron Microscopy Sciences) containing 7% glucose for 1 h at room temperature, washed three times in maleic acid, and incubated 1 h in uranyl acetate (Electron Microscopy Sciences) (2% solution dissolved in maleic acid). Sections were then washed three times in maleic acid, dehydrated in an ascending ethanol series, rinsed for 2 min, two times in propylene oxide, and embedded in Durcupan (ACM; Fluka Neu-Ulm). Additional tissue processing was performed as described by Doetsch *et al.* (Doetsch F, 1997). The evaluation of the cellular characteristics was performed in the first 500 µm from the injury limit.

2.2.3. Biochemical procedures

Animals (n=6 for each group) were decapitated after being sacrificed. Brains were quickly removed from skull and placed in cold PBS 0.01 M pH 7.5. The injured area was obtained by a punch (2 mm internal diameter). The tissue was extracted and homogenized according to the biochemical procedure.

2.3. Histological staining

Haematoxylin-eosin staining was performed for histological detection of the injured area by using brain sections from LA treated (CR+LA) and not treated animals (CR).

2.4. Cytological study

Central sections of the injury were selected in order to do the cytological study. In all procedures the evaluation of the cell density (n° cells/mm²) was quantified in the first 500 μ m from the injury limit.

2.4.1. Proliferation Study

Sections were rinsed in PBS 0.01 M pH 7.5 and incubated with 10% methanol in PBS-Triton 0.1% for 20 minutes and boiled in citrate buffer 10 mM pH 8 for 30 minutes. Then sections were immersed in HCl 2 N at 37°C for 30 min and then in Borate buffer 0.1 M pH 8.5 for 10 minutes. Sections were rinsed in PBS for three times and after in 3% H₂O₂ and 10% Methanol solution in PBS-Triton 0.1% in darkness for 15 min to block unspecific binding sites and endogenous peroxidase blocking. Sections were incubated overnight at 4°C with specific primary antibody anti-BrdU biotinilated (Invitrogen) and 20% Fetal Bovine Serum (FBS) in PBS-Triton 0.1% (1:200). Then sections were incubated in avidin-biotin-peroxidase complex (Atom) for 1 h. Staining was developed with DAB (Vector Laboratories) the reaction was stopped by washing with PB. Sections were dehydrated and coverslipped.

2.4.2. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin-Dutp Nick End Labelling (TUNEL)

In order to evaluate cell death, TUNEL technique was performed by a standard *in situ* cell death detection kit (Roche Diagnostics). Sections were covered in darkness with DAPI Vectashield (Vector Laboratories) and observed with a Nikon fluorescence microscope.

2.4.3. Immunocytochemical Procedures

Sections were washed three times with PBS 0.01 M for 5 min at room temperature, blocked for 2 hours with 20% FBS in PBS-Triton 0.1% and incubated at 4°C overnight with primary antibodies against: Collagen IV (1:200, Abcam); GFAP (1:500, Dako Cytomation), BrdU (1:200, Sigma Aldrich), ED1 (1:200, Chemicon), Iba1 (1:200, Wako), Tuj1 (1:200, Abcam), MAP2 (1:200, Millipore).

Alexa 488 (1:200, Invitrogen) and Alexa 555 (1:200, Invitrogen) were used as secondary antibodies incubating for 2 h at room temperature in darkness. Afterwards, sections were mounted with DAPI Vectashield (Vector Laboratories) and images were taken with a Nikon Confocal Microscope.

2.5. Biochemical Procedures

Homogenates of microdissected tissue were diluted in 300 μ L of PB 0.1 M pH 7.1 and centrifuged at 6000 rpm for 2 min at 4°C and supernatant was sorted at -20°C until use.

2.5.1. Total Antioxidant Capacity

Total antioxidant capacity of the samples (animals of 7 days) was determined with the Antioxidant Assay Kit (Cayman Chemical Company). The assay was performed according to manufacturer's instructions. Absorbance was measured at 405 nm using a plate reader (VICTOR Perkin Elmer 2030) and data of antioxidant capacity were referred to protein levels obtained by Lowry's method (Lowry et al., 1951).

2.5.2. Glutathione Measurements by HPLC

Homogenates of brain-dissected tissues (animals of 7 days) were analyzed by a Gilson HPLC following Reed's method (Reed and Fariss, 1984). System consisted of two Gilson 322 pumps, a 234 Gilson autosampler injector, a Gilson serial Input/Output Chanel (GSIOC) and a Gilson 156 UV/VIS detector. The system was controlled and chromatograms were analyzed by a personal computer 486/50 Hz using a Unipoint™ System software program. Kromasil Amino 5 µm, 250 x 4.6 mm columns were used. Flow rate selected was 1 mL/min of 80% Mobile Phase A (80% methanol in HPLC-grade water) and 20% Mobile Phase B (Sodium Acetate 5 M in 80% of Methanol). GSH values were referred to protein levels determined by Lowry's method (Lowry et al., 1951).

2.6. Biochemical Study By Electrophoresis And Western Blotting

Brain homogenates were made with a lysis buffer supplemented with DTT 1 mM, NaF 10 mM, Complete 1X and Na₂VO₄ 1 mM, and centrifuged at 14.000 rpm for 20 minutes and the supernatant was collected. Electrophoresis was performed at 200 V for 75 min.

Western Blot was performed for COL4A2 (1:500, Santa Cruz); VEGF (1:500, Santa Cruz) and BDNF (1:500, Santa Cruz). IgG HRP F(ab) (1:5000, Santa Cruz) was used as secondary antibody. The reaction was revealed by ECL-Plus detection system (Ameshan Biotech) and was analyzed with ImageQuant LAS 4000.

2.7. Magnetic Resonance Study

The anatomical and functional study of animals was carried out with MRI equipment of 7 teslas.

The oximeter is calibrated initially to ensure that the percentage of the mixture of gases was correct. Opens gas (N₂O and O₂) up to 1 bar. Connect the tubing from the gas lines to the oximeter. Evaluate columns for a gas mixture of 30% O₂ and 70% N₂O. Open isofluorane vaporizer to 4% and open line induction chamber. Weigh the animal before each experiment and put the animal in the induction chamber. After approximately 5 minutes, when the animal is below 100 breaths per minute (bpm) to open the gas line that goes to the platform.

Anatomical study and data for functional study were obtained through the program ParaVision 5.03 of Bruker BioSpin MRI.

2.7.1. Structural Study

Quickly take the animal to the platform, replace the pad under the animal's chest, put the mask and reduce to 1.5% isoflurane. Use the bar teeth and ears to fix the animal's head in the holder. Place the head of the animal in the magnet isocenter and start as scanners. The data was obtained with ParaVision program 5.03 of Bruker BioSpin MRI T2 transverse images are made in each anteroposterior direction 1 mm.

2.7.2. Functional Study

Weigh the animal, injecting 1 mg/kg medetomidine (Domtor®, Pfizer, Spain). Prepare medetomidine bolus of 0.05 mg/kg and connect it to the line, programming the pump to release 1 mL/h. This will provide a continuous infusion of 0.1 mg/kg/h of Domtor the animal. Then, take the animal to the platform and follow the procedure described above. Subcutaneous electrodes inserted in each leg. Inject bolus and decrease gradually the percentage of isoflurane (5-15 min) controlling breathing. After 15 min, turn on the infusion pump and close the vaporizer.

Place the head of the animal in the magnet isocenter and start the MRI procedure: it takes a-rest stimulation pattern of 45 sec of stimulation followed by 15 sec of rest (5 min 45 sec in total). First is performed on the contralateral side to verify that the correct activation and then the side to be tested. Among stimulation to the animal is allowed to stand for 3 minutes.

When the procedure ends, the animal is removed from the magnet, withdraw the electrodes and remove the pet from the platform. Wake up the animal with an intraperitoneal injection 1 mg/kg of atipamezole (Antisedan®, Pfizer, Spain).

2.8. Quantification and Statistical Analysis

Antioxidant capacity analysis and GSH values were determined in each animal group (n=6) per duplicate.

In order to do the quantification of the cytological study, four sections of each animal group (n=6) were selected. Immunocytochemical images were quantified with Image J 1.44i for Mac. The evaluation of the cell density (n° cells/mm²) was quantified in the first 500 µm from the injury limit in LA experiment and inside the biomaterial in second experiment. The number of cells was determinate by the nuclei presence and referred to the total area quantified. The percentage of area occupied by astrocytes and blood vessels was calculated as the area occupied by the corresponding marker referred to total area quantified.

For the biochemical study the homogenates of each animal group (n=6) were done per duplicate and western blot was done three times in all cases. The result of western blot was analysed with ImageQuant.

To perform the statistical analyses of the data, GraphPad Prism 4 for Mac was used. Statistical significances were assessed by one-way ANOVA followed by least significance differences (LSD) test for more than two groups with one condition and two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test for two conditions and Student's T-test for only two groups. Data are represented as means \pm standard deviation, and differences are considered significant at $p < 0.05$. Asterisks over the bars indicate statistically significant differences versus control.

3. Results

3.1. Evaluation of lipoic acid treatment after the brain cryo-injury

3.1.1. Antioxidant capacity and the presence of neurotrophic factors in the injured area after lipoic acid treatment

Antioxidant capacity and GSH levels were measured after 7 days of LA treatment (Figure 3). The injured brain homogenate samples of the cryo-injured and LA non-treated group (CR) (Figure 3.A) presented lower antioxidant capacity than control animals ($p < 0.001$). However, when cryo-injured animals were treated with LA (CR+LA) the antioxidant capacity increased significantly compared with the non-treated group ($p < 0.01$).

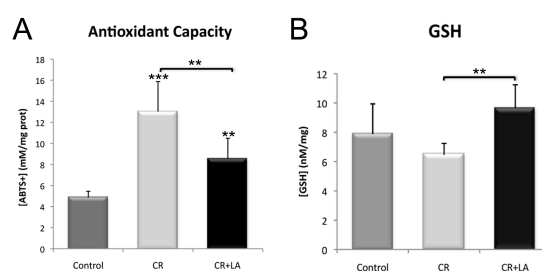


Figure 3. Measure of the antioxidant capacity after 7 days of brain homogenate samples by ELISA (A). GSH measurement by HPLC from homogenated brain tissue (B). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

In addition, GSH levels (Figure 3.B) showed a statistical significant increase in LA treated group compared with untreated group ($p < 0.01$).

3.1.2. Histological and ultra-structural characterization of the injured area

In order to characterize the morphology of the cortical brain injury, a hematoxylin-eosin staining was performed. The cryo-injury was done satisfactorily as shown in coronal section (Figure 4.A) and transverse section (Figure 4.B). The brain-injured area was located close to the lateral ventricle (LV) (Figure 4.C) and a higher magnification (Figure 4.D) showed the histological appearance of the lesion. In LA non-treated animals, exist a cystic cavity (CC) completely defined, delimited by a scar (arrows in Figure 4.E). In opposition, in LA treated animals (Figure 4.F), the CC is not well defined because of the presence of neural tissue (arrow heads in Figure 4.F) grown inside the CC from the edge of the lesion (arrows in Figure 4.F).

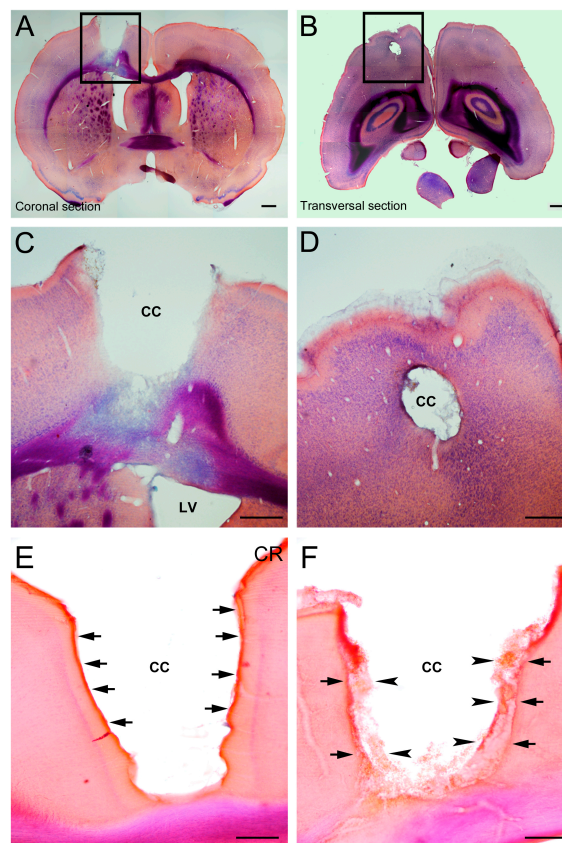


Figure 4. Haematoxylin-eosin staining of the cortical brain injury localized close to lateral ventricle (LV) in a coronal sight (A) and sagittal sight (B). A detail of the injury in coronal (C) and sagittal sight (D). And the histological appearance the cystic cavity (CC) of the injury in a non-treated animal (CR) (E) and LA treated animal (CR+LA) (F). Arrows indicate the limit of the injury and arrowheads indicate the new neural tissue. Scale bar = 500 μ m in A, B, C,D; 250 μ m in E,F.

When the adjacent area to the lesion is examined, we observed obvious differences in the evolution of the neural tissue after 15 days comparing non-treated and LA treated group. An image of a semithin section of a non-treated animal showed three delimited zones (Figure 5.A). First zone is close to the CC, formed by a glial scar (GS). Following this zone there is a damaged zone (DZ) characterized by a lot of intercellular spaces, dying cell and some microglial cells. And the third is the intact zone (IZ), composed by neural tissue that has not suffered any change because of the injury. Close to the CC we observed the GS with more details in ME images (Figure 5.B), and we are able to discriminate a large number of intermediate filaments of this astroglial cells that form the GS (asterisks in Figure 5.C).

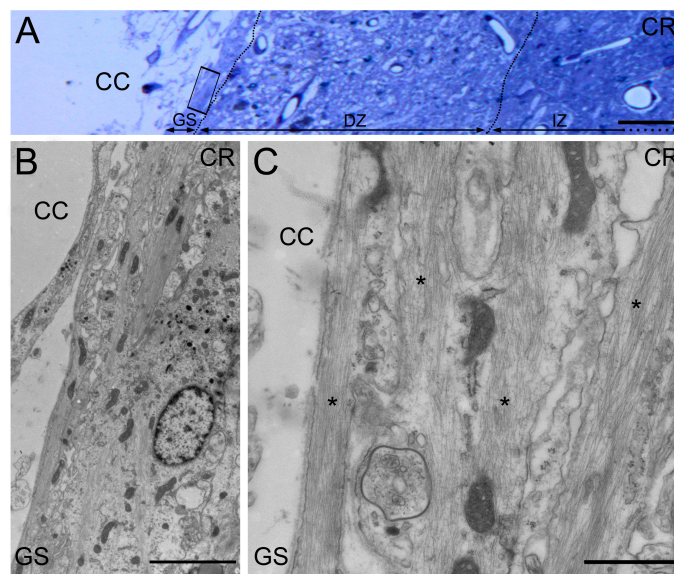


Figure 5. Image of a semithin stained section (A) of a non-treated animal (CR). The pointed lines delimit three principals zones. First zone close to the cystic cavity (CC) is the glial scar (GS); second zone is the damaged zone (DZ) and third is the intact zone (IZ). Image of electron microscopy of the glial scar (B). Asterisk indicates the intermediate filaments of the astrocytes cells forming the glial scar (C). Scale bar = 50 μm in A; 5 μm in B; 1 μm in C.

On the other hand, LA treated animal (CR+LA) presented a few differences in the three zones (Figure 6.A). In the first zone there no exist a glial scar, instead there is a regeneration zone (RZ). The tissue has grown to invade the CC, is an area of remodelling. The following two zones are the same as in the non-treated animals: a damaged zone (DZ) and an intact zone (IZ). Images taken by ME showed the presence blood vessels, glial cells and some axons in the RZ (Figure 6.B), the DZ (Figure 6.C) and the IZ (Figure 6.D). In the figure 4E (Figure 6.E) is shown a great

deal of intercellular spaces (blue color) in the RZ, which decrease in the DZ (Figure 6.F) and finally, in the IZ, the intact tissue has no intercellular spaces (Figure 6.G).

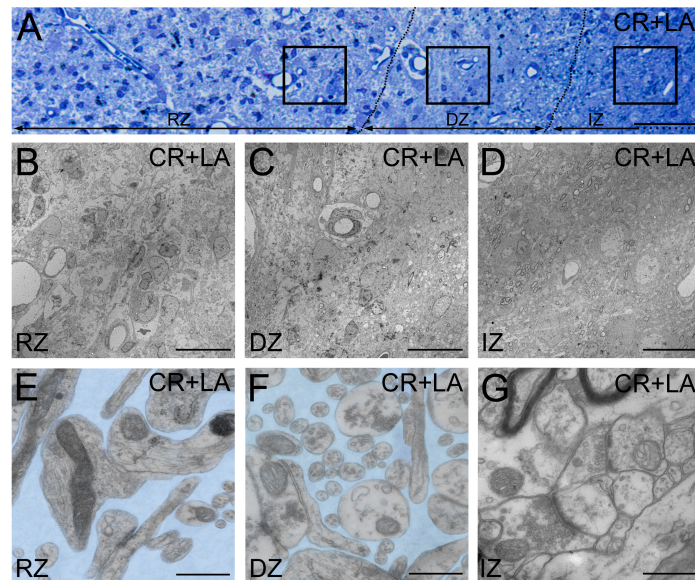


Figure 6. Image of a semithin stained section (A) of a LA treated animal (CR+LA). The pointed lines delimit three zones. First zone is the regeneration zone (RZ), second zone is the damaged zone (DZ) and third zone is the intact zone (IZ). Image of electron microscopy of the RZ (B, E), DZ (C, F) and IZ (D, G). The blue colour in figure E and F indicate the intercellular spaces. Scale bar= 50 μm in A; 20 μm in B, C, D; 600 nm in E, F, G.

3.1.3. Effect of lipoic acid on cell survival

The TUNEL technique was used in order to analyze the effect of LA on cell survival 15 days after brain injury. Test assay was performed onto brain tissue sections of LA non-treated animals (CR) and LA treated animals (CR+LA) in the first 500 μm from the CC, showing a statistically significant decrease ($p < 0.05$) of the density of dead cells ($\text{n}^\circ \text{ cells}/\text{mm}^2$) (**Figure 7.A**) in animals treated with LA compared with non-treated.

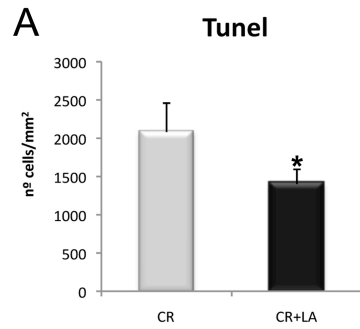


Figure 7. Measurement of TUNEL positive cells in the injured area after 15 days. * $p < 0.05$.

3.1.4. Proliferation and differentiation events after lipoic acid treatment

Immunohistochemistry for BrdU was done in the injured area of non-treated animals (Figure 8.A) and LA treated animals (CR+LA) (Figure 8.B) 15 days after the injury. Statistical study (Figure 8.C) showed a significant increase ($p < 0.05$) in the density of BrdU labelled cells in the LA treated group compared with non-treated. Interestingly, the BrdU positive cells in non-treated animals were distributed along the injury limit, while in the LA treated animals; these labelled cells were dispersed in the injured area.

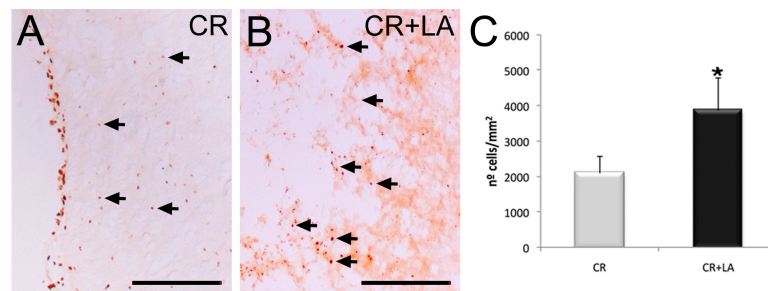


Figure 8. Immunohistochemistry for BrdU in injured area of non-treated animals (A) and LA treated animals (B). Arrows indicate BrdU positive cells. Scale bar = 500 μm . Quantification of the density of BrdU positive cells (n° cells/ mm^2) in the injured area. * $p < 0.05$.

Close to the cortical brain injured area, BrdU labelled cells differentiated to different cell types after 15 days. Thus co-labelling studies by immunohistochemistry against glial cells (GFAP)

and blood vessels (Collagen IV) showed that the majority of BrdU⁺ cells co-labelled with GFAP⁺ (Figure 9.A) and Collagen IV⁺ (Figure 9.B) cells in animals treated with LA for 7 days.

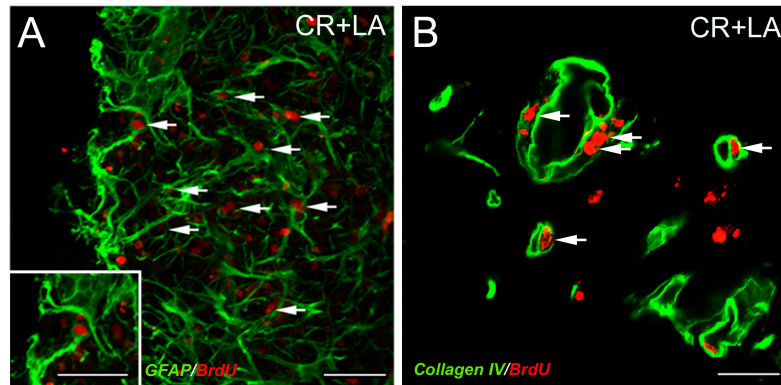


Figure 9. Immunohistochemistry for BrdU (red) and GFAP (green) (A) and BrdU (red) and Collagen IV (green) (B) in LA treated animals (CR+LA). Arrows indicate co-labelling between two markers. Scale bar = 100 μ m in A; 50 μ m in B.

3.1.5. Glial reactivity after lipoic acid treatment

Treatment with LA clearly diminished the glial scar that surrounds the injured area after 15 days from the brain injury (Figure 10.A and 10.B). The evaluation of the glial cells of the injured area showed morphological differences between groups and, apparently, an increase in the number of glial cells in non-treated group (Figure 10.C), compared with the LA treated group (Figure 10.D). However, the quantification of the density (n° cells GFAP⁺/mm²) of GFAP labelled cells (Figure 10.E) showed no statistically significant differences between LA treated and non-treated group, but, statistically significant increase ($p < 0.01$) of the density of these cells was observed in both groups compared with control group. On the other hand, we quantified the percentage of area occupied by glial cells (Figure 10.F) and we observed a statistically significant increase ($p < 0.001$) in non-treated group compared with control group, and this area was significantly decreased ($p < 0.01$) in LA treated group (CR+LA). In that way, astrocytes size of the injured and non-treated animal was 45 % bigger than normal astrocytes (Control) and LA treatment (CR+LA) reduced the size of astrocytes to 34 %.

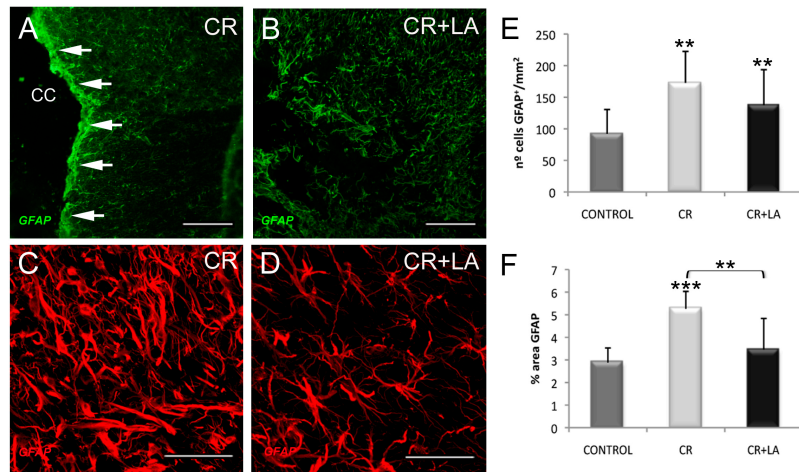


Figure 10. Immunohistochemistry assay for GFAP in the injured area of non-treated animals (A) and LA treated animals (B). Arrows indicate the glial scar formed in non-treated animals. Appearance of astrocytes in non-treated animals (C) and LA treated animals (D). Scale bar = 200 μ m in A, B; 200 μ m in C, D. Quantification of the density of astrocytes (n° cells GFAP⁺/mm²) (E) and area occupied by astrocytes (% area GFAP⁺) (F) in each group. **p < 0.01; ***p < 0.001.

It has been previously described that the BBB is affected after a TBI (Shlosberg et al., 2010). Our first aim was to evaluate the organization of the BBB. Immunohistochemistry for Collagen IV (blood vessels) and GFAP (astrocytes) was done in control animals (Figure 11.A), untreated animals (Figure 11.B) and LA treated animals (Figure 11.C) 15 days after the injury, to study some parameters about the BBB.

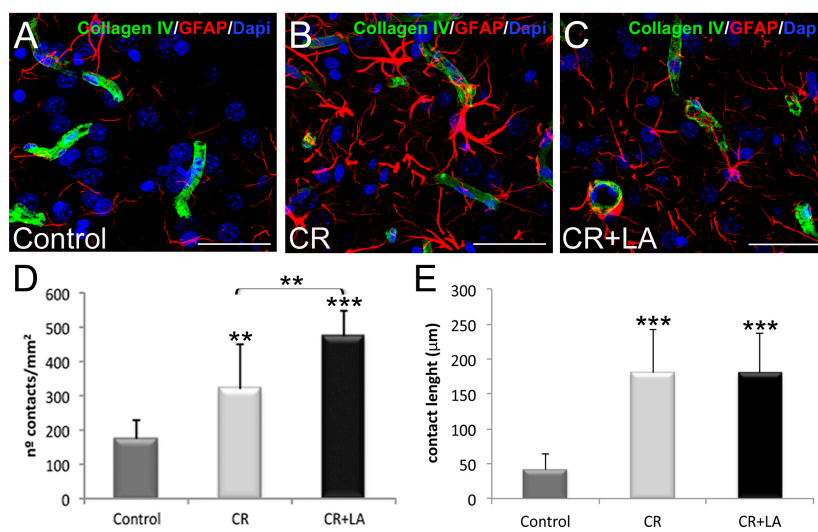


Figure 11. Immunofluorescence for GFAP (astrocytes) and Collagen IV (blood vessels) in control animals (A), injured and LA non-treated (B) and injured and LA treated (C). Scale bars: 50 μ m. Quantification of the density of the contacts (contact number/mm²) (D) and the total length of the contacts (μ m). ** p < 0.01, *** p < 0.001.

The quantification of the number of contacts (n° contacts/ mm^2) established between astrocytes and blood vessels (Figure 11.D) showed that both untreated and LA treated groups presented a statistical significant increase ($p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively) in contacts number compared with control group. Moreover, LA treated group showed an increase ($p < 0.01$) compared with untreated group.

In addition, when the total length (μm) of the whole contacts (Figure 11.E) was measured, a significant increase in the total length of the contacts ($p < 0.001$) was observed in both experimental groups (CR and CR+LA).

3.1.6. Angiogenesis after lipoic acid treatment

The presence of blood vessels was evaluated performing immunohistochemistry for Collagen IV. In animals non-treated with LA, blood vessels appeared with a random distribution along the injured area (Figure 12.A). In contrast, the distribution of blood vessels in LA treated animals (CR+LA) was apparently with a parallel distribution and in the direction of the lesion (Figure 12.B). The quantification of the area occupied by blood vessels (Figure 12.C) showed a statistically significant increase ($p < 0.05$) of this area in LA treated group (CR+LA) compared with non-treated (CR).

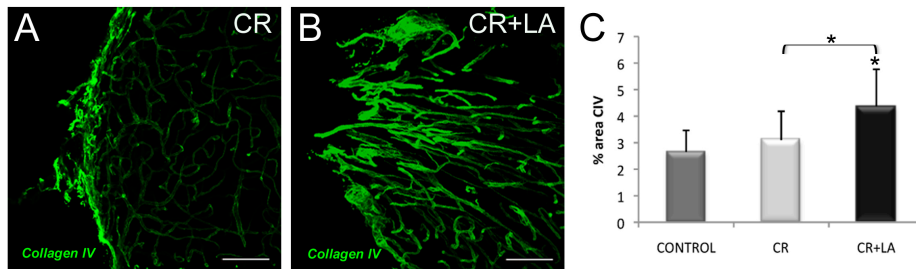


Figure 12. Immunohistochemistry for Collagen IV in non-treated animal (A) and LA treated animals (B). Scale bar: 200 μm . Quantification of area occupied by blood vessels (% area CIV*). * $p < 0.05$.

We have already observed that LA promotes new blood vessels formation after a brain injury compared with non-treated animals. In order to understand the molecular mechanism of the blood vessels formation, we administered bevacizumab (Avastin) that blocks VEGF. Western blot for VEGF were done to corroborate the effect of Bevacizumab on VEGF and for collagen (COL4A2) (Figure 13.A).

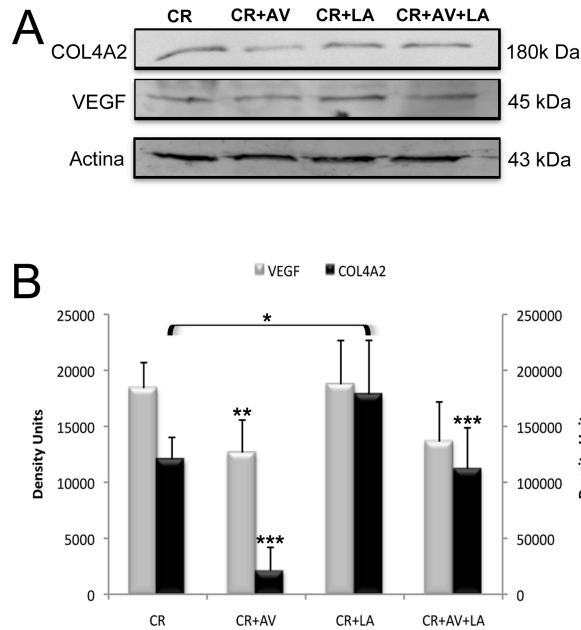


Figure 13. Immunohistochemistry for Collagen IV in animals administrated with Bevancizumab (Avastin) in non-treated animals (A) and LA treated animals (B). Scale bar = 200 μ m. Image of a western blot for COL4A2 and VEGF proteins (C). Quantification in density units of COL42 and VEGF proteins. CR: non-treated animals; CR+AV: non-treated animals with Avastin ; CR+LA: LA treated animal; CR+AV+LA: LA treated animals with Avastin. VEGF: CR vs CR+AV**, COL4A2: CR vs CR+AV***; CR vs CR+LA*; CR+AV vs CR+AV+LA***. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

The quantification (Figure 13.B) showed that when Bevancizumab was administered to the animals (CR+AV and CR+AV+LA) was observed a significant decrease in VEGF values and also a statistically significant decrease ($p < 0.001$) of collagen values compared to control group (CR and CR+LA respectively), indicating that VEGF is, almost in part, responsible of the synthesis of collagen. However, collagen values were increased ($p < 0.001$) in LA treated animals (CR+AV+LA) compared with non-treated animals (CR+AV), showing that LA is able to stimulate the synthesis of collagen by itself.

3.1.7. Microglial response

Microglial cells are the cell brain responsible of the immune response. Those were revealed by immunostaining with the marker Iba1 in order to see cell morphology (Figure 14). Images taken 15 days after the injury showed ramified microglia in untreated animals (Figure 14.A) but presented amoeboid microglia in LA treated group (Figure 14.B). The quantification of the density of Iba1 positive cells (Figure 14.C) showed a statistically significant increase in both experimental groups 15 days after the injury compared to control ($p < 0.001$).

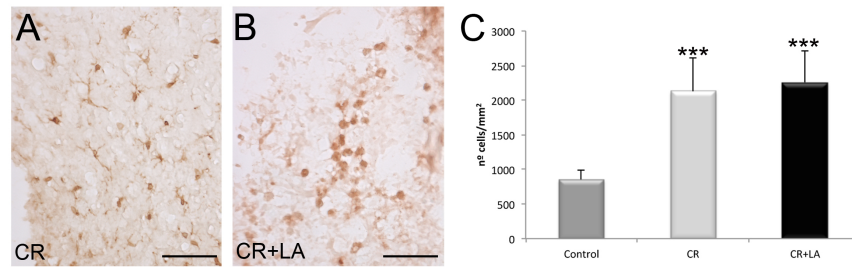


Figure 14. Immunohistochemistry for Iba1 in untreated animals (A) and treated animals (B). Scale bars: 100 μ m. Quantification of cell density Iba1 positive (n° cells/mm²) (C). *** p < 0.001.

On the other hand, activated microglia/macrophages were evaluated through immunohistochemistry for ED1 (Figure 15.A and 15.B). The quantification of the density of cells (n° cells/mm²) (Figure 15.C) showed an statistically significant increase in both experimental groups 15 days after the injury (p < 0.01 and p < 0.001 respectively). Moreover, activated microglia were statistically significant increased in LA treated group compared with non-treated group (p < 0.05).

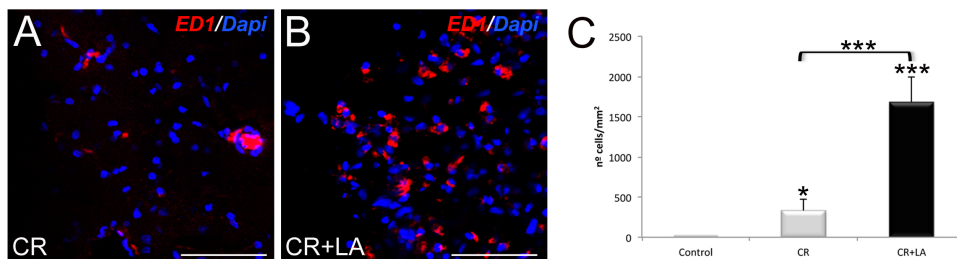


Figure 15. Immunofluorescence for ED1 in untreated animals (A) and treated animals (B). Scale bars: 200 μ m. Quantification of positive ED1 cell density (n° cells/mm²) (C). * p < 0.05, *** p < 0.001.

3.1.6. Molecular study of pCREB and BDNF

On the other hand, the quantification of the western blots after 15 days (Figure 16.A), showed a statistically significant increase (p < 0.01 and p < 0.001 respectively) of both pCREB (Figure 16.B) and BDNF (Figure 16.C) proteins in the LA treated group (CR+LA) compared with the non-treated group (CR).

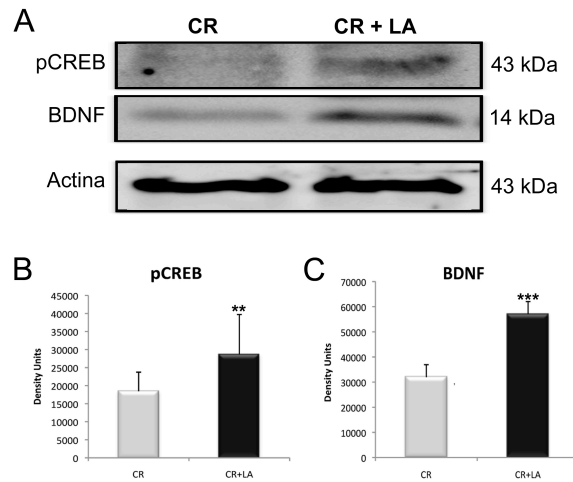


Figure 16. Image of the band detection for pCREB (Left) and BDNF (Right) proteins. Quantification of the band density of pCREB protein (B) and BDNF protein (C). **p < 0.01; ***p < 0.001.

3.2. Evaluation of the combined use of lipoic acid treatment and p(EA-co-HEA) 90/10 biomaterial after brain cryo-injury

3.2.1. Histological study of the biomaterial implantation

Biomaterial was successfully implanted in the coordinates described previously (see section 2.1.2 de *Materials y Methods*), close to SVZ (Figure 17.A). We found no rejection from the brain tissue in case case. In addition, we observed continuity between the biomaterial and the neural tissue (Figura 17.B).

On the other hand, it was very important that the biomaterial were perfectly inserted close to the lateral ventricle (Figure 17.C) to make it accessible the proliferation and migration of cells from SVZ, and fortunately, biomaterial was colonized for an important number of cells (Figure 17.D).

The staining showed apparently that the cell density inside the biomaterial was lower in untreated animals (Figure 18.A y 18.B) rather than LA treated animals (Figure 18.C y 18.D), and even they presents less cytoplasmic expansions.

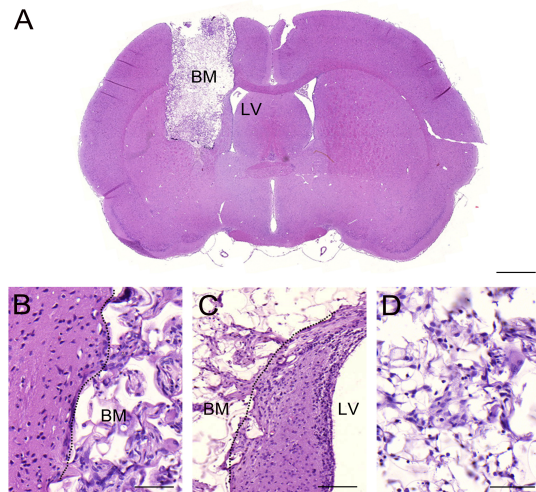


Figure 17. Haematoxylin-eosin staining of a brain coronal section with BM (A). Boundary between the old tissue and the BM tissue (B). Biomaterial close the LV (C). Image of the inside of BM (D). The dotted line delimits the WB neural tissue. BM: biomaterial, LV: lateral ventricle. Scale bars: 500 μm in A, 100 μm in B and 500 μm in C and D.

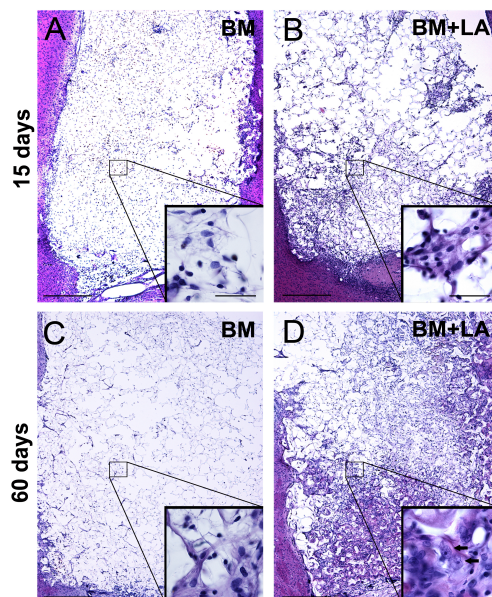


Figure 18. Haematoxylin-eosin staining of the biomaterial. BM: biomaterial, BM+LA: biomaterial and lipoic acid treatment. Scale bars: 200 μm and 50 μm in the expansions.

Counting the cellular density inside the biomaterial, we confirmed that (Figure 19), the number of cells at 15 days was much lower in both untreated and LA treated animals compared to control ($p < 0.001$ and $p < 0.05$ respectively), but there were not statistical differences between both experimental groups. However, at 60 days, LA treated group increased the number of cells compared with untreated group ($p < 0.05$), reaching control values.

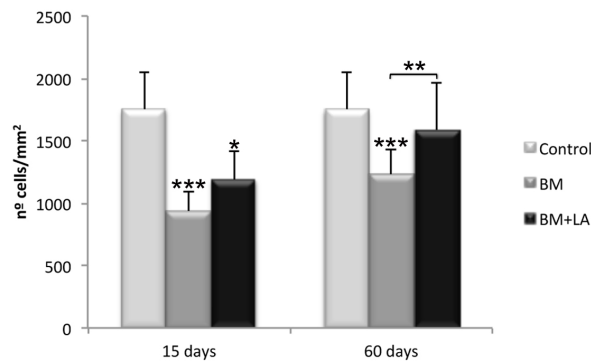


Figure 19. Cell density (n° cells/mm²) present in the biomaterial for each of the groups at both times. Control: no injury or biomaterial, BM: biomaterial injured but untreated, BM+LA: injured, biomaterial and LA treatment.

3.2.2. Study of the angiogenesis inside the biomaterial

The presence of blood vessels is of a remarkable importance to oxygen supply. For that reason we evaluate the presence of blood vessels inside the biomaterial through immunofluorescence of Collagen IV (Figure 20.A-L).

The density of cells Collagen IV (Figure 20.M), showed a statistical significant increase in LA treated group compared with untreated at 15 days ($p < 0.01$). However, at 60 days, we found an increase in both experimental groups compared with control ($p < 0.01$).

On the other hand, the percentage of Collagen IV cells was calculated (Figure 20.N). At 15 days, we found en a statistical significant decrease in untreated group and an increase in LA treated group compared with control ($p < 0.05$ and $p < 0.001$ respectively). And we observed a statistical significant increase in LA treated group compared with untreated ($p < 0.001$). At 60 days, we found s statistical significant increase in untreated group compared with control ($p < 0.01$) and a decrease in LA treated group compared with untreated ($p < 0.01$).

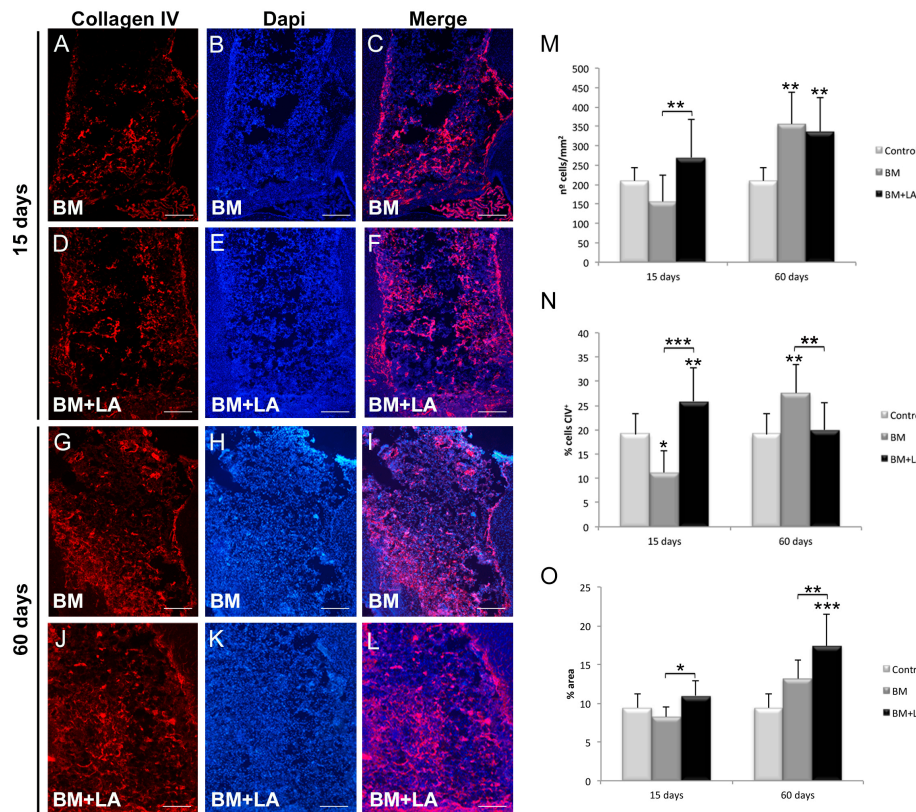


Figure 20. Immunofluorescence for Collagen IV (blood vessels) at 15 days in untreated animals (A-C) and LA treated animals (D-F), and at 60 days in untreated animals (G-I) and LA treated animals (J-L). Scale bars: 200 μ m. The graphs represent the quantification of collagen positive cell density (n° cells/mm²) (M), the percentage of cells (% cells CIV⁺) (N) and the percentage of area occupied by blood vessels (O). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

In addition, area extended by blood vessels was quantified (Figure 20.O), observing an statistical significant increase of this area in LA treated animals compared with untreated animals at 15 and 60 days ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectively), and between LA treated group and control at 60 days ($p < 0.001$).

3.2.3. Study of the astroglial reactivity inside the biomaterial

Immunofluorescences for GFAP (astrocytes) were done in order to study the astroglial reaction inside the biomaterial (Figure 21.A-L).

The quantification of the cell density (Figure 21.M) showed, a statistical significant increase in LA treated animals compared to control at 15 and 60 days ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectively). The percentage of cells (Figure 21.N), showed at 15 days, a statistical significant decrease in untreated group compared with LA treated group and control ($p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively) and a

statistical significant decrease in both experimental groups compared with control at 60 days ($p < 0.001$ in BM and $p < 0.01$ in BM+LA).

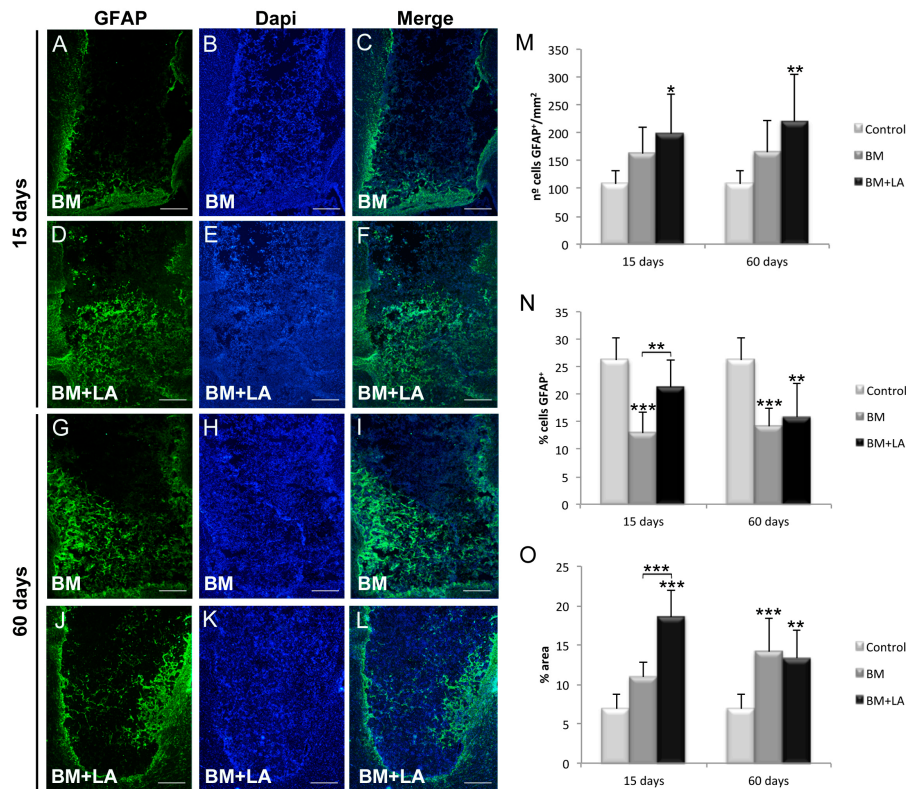


Figure 21. Immunofluorescence for GFAP (astrocytes) after 15 days in untreated animals (A-C) and LA treated animals (D-F), and at 60 days in untreated animals (G-I) and treated animals (J-L). Scale bars: 200 μ m. The graphs represent the quantification of collagen positive cell density (n° cells/ mm^2) (M), the percentage of cells (% GFAP⁺ cells) (N) and the percentage of area occupied by astrocytes (O). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

In addition, the percentage of GFAP positive cells was quantified (Figure 21.O). We found at 15 days a statistical significant increase in LA treated group compared with untreated and control ($p < 0.001$). However, at 60 days, we observed a statistical significant increase in untreated group compared to control ($p < 0.001$) and a decrease in LA treated group.

3.2.4. Study of the microglial reactivity inside the biomaterial

The study of the presence and morphology of microglial cells was carrying out though immunofluorescences of Iba1 and simultaneously with ED1 to observe microglial activation/macrophages (Figure 22).

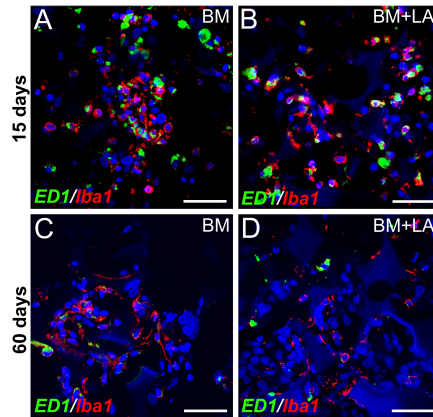


Figure 22. Immunofluorescence for ED1 (green) and Iba1 (red) after 15 days in untreated animals (A) and LA treated animals (B), and at 60 days in untreated animals (C) and LA treated animals (D). Scale bars: 50 μ m.

The density of the Iba1 cells showed (Figure 23.A) a statistical significant increase in both experimental groups compared with control at 15 and 60 days. On the other hand, the percentage of Iba1 cells (Figure 23.B) showed a statistical significant increase in LA treated group at 15 days compared with untreated group and control ($p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively). And at 60 days, we found no differences between groups.

The number of ED1 cells showed a statistical significant increase in both experimental groups compared to control at 15 and 60 days ($p < 0.001$) and a statistical significant decrease in LA treated group compared with untreated ($p < 0.01$) at 15 days (Figure 23.C). In addition, the percentage of ED1 cells (Figure 23.D) showed a statistical significant increase in both experimental groups at 15 and 60 days ($p < 0.001$).

The study of the colocalization between the two markers (Iba1 and ED1) showed a statistical significant increase of the number of cells expressing both markers at 15 and 60 days ($p < 0.001$) and a decreased in LA group compared with untreated at 15 days ($p < 0.05$) (Figure 23.E).

On the other hand, we quantified the number of cells expressing only one marker. We found that the number of cells expressing only the marker ED1 (macrophages) (Figure 23.F), were increased in both experimental groups compared with control ($p < 0.01$ in BM and $p < 0.05$ in BM+LA) and in untreated group at 60 days compared with control ($p < 0.001$). On the hand, the evaluation of cells expressing only the marker Iba1 (resting microglia) (Figure 23.G). We found the number of these cells were statistical decreased in LA treated group at 15 days compared to control ($p < 0.05$) and at 60 days, the untreated group showed a statistical significant increase compared with LA treated and control group ($p < 0.001$ and $p < 0.01$ respectively).

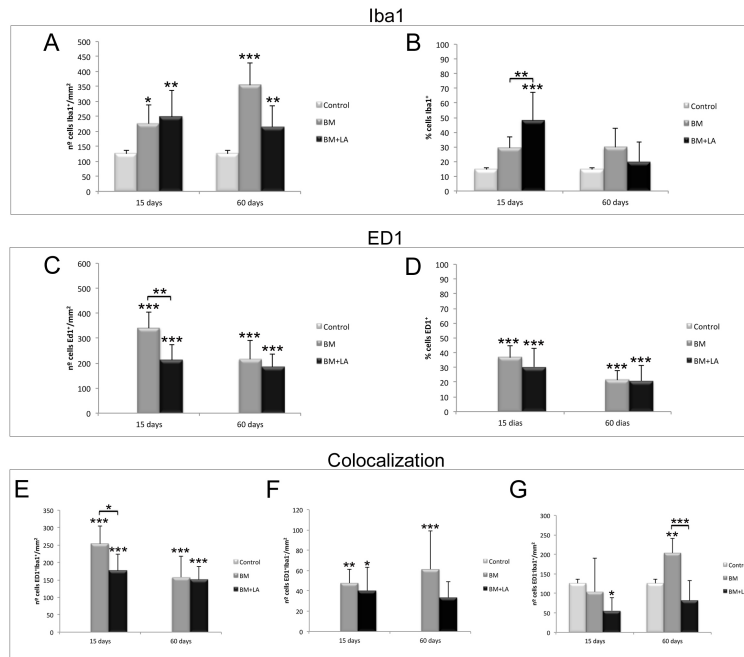


Figure 23. The graphs represent Iba1 cell density (n° cells/mm²) (A), the percentage of cells Iba1 (B), ED1 cell density (C), ED1 cell percentage, the number of Iba1 and ED1 co-labelling (E), the density of single cells positive Iba1 (F) and the density of only ED1 positive cells (G). *p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001.

3.2.5. Neural cells inside the biomaterial

A preliminary study inside the biomaterial at 15 days showed that the number of neurons were too lower, that the reason why the images and data showed are form animals of 60 days.

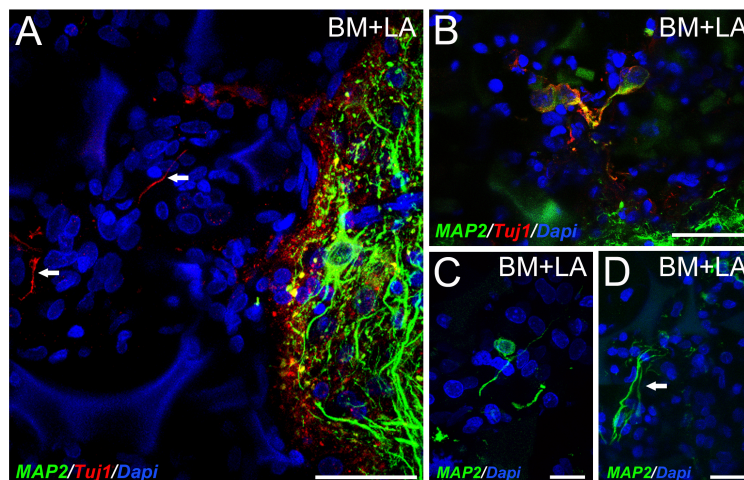


Figure 24. Immunofluorescence for Tuj1 (immature neurons) in red and MAP2 (mature neurons) in green in LA treated animals at 60 days (A and B), the nuclei are marked with DAPI in blue. Immunofluorescence for MAP2 in treated animals (C and D). The white arrows indicate the axons within the biomaterial. Scale bars: 100 um in A and B, 50 in C um, 25 um in D.

We found, in animals treated with LA, some young neurons terminations (Tuj1) extending inside the biomaterial (Figure 24.A). Moreover, we found some young neurons expressing markers from mature neurons (MAP2) (Figure 24.B), and in some cases, completely mature neurons extending nervous terminations inside the biomaterial (Figure 24.C-D)..

The quantification of the number of immature neurons (Tuj1) (Figure 25.A) showed a statistical significant increase in LA treated group compared with untreated and control group ($p < 0.05$). On the other hand, mature neurons showed a statistical significant decrease in untreated group and an increase in LA treated group compared to control ($p < 0.001$ and $p < 0.05$ respectively) and, LA treated group showed a statistical significant increase of mature neurons compared with untreated ($p < 0.001$).

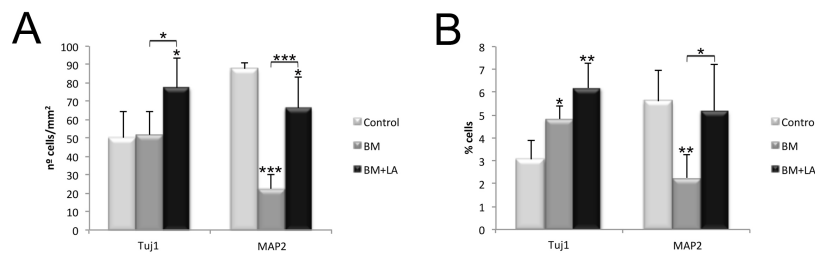


Figure 25. Quantification of cell density (n° cells/mm²) MAP Tuj1 + and + (A) and percentage of each cell type (B) in each of the groups. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

In addition, the percentage of cells was quantified (Figure 25.B), showing an statistical significant increase in both experimental groups compared with control ($p < 0.05$ in BM and $p < 0.01$ in BM+LA) when immature neurons were quantified, and a statistical significant decrease in untreated group compared with control and LA treated group when matured neurons were quantified ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively).

3.2.6. Structural and functional study through MRI

In order to develop the structural and functional study, magnetic resonances of the animal brains were done. Structural T2 scanners were done in untreated (Figure 26.A) and LA treated animals (Figure 26.B) with the biomaterial implanted. In T2 scanners, the fat is identified in dark colours and water is identified in white colour.

The evaluation of these scanners in grey values showed a statistical significant decrease in both experimental groups compared with control animals when biomaterial area was evaluated at 2 and 6 months ($p < 0.001$) and, a statistical significant increase in LA treated group compared to untreated group at 6 months ($p < 0.001$) (Figure 26.C).

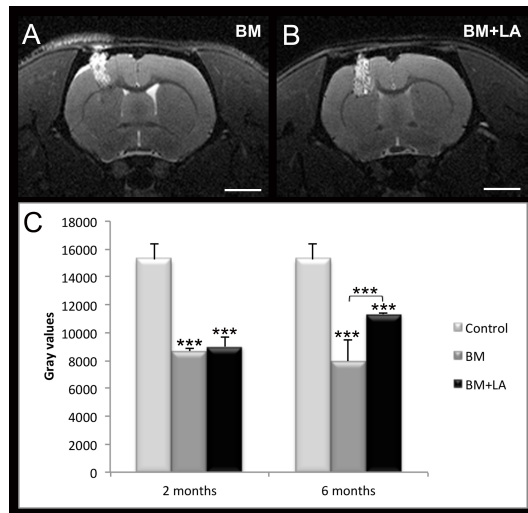


Figure 26. T2 scanner images of an untreated animal (A) and LA treated (B) in which you can see the biomaterial inserted. Quantification inside the biomaterial at 2 and 6 months in grey values (C). *** $p < 0.001$.

We developed a study through functional magnetic resonance imaging (fMRI) to evaluate the functionality inside the biomaterial after 2 months. Red pixels indicate activation area (Figure 27 up).

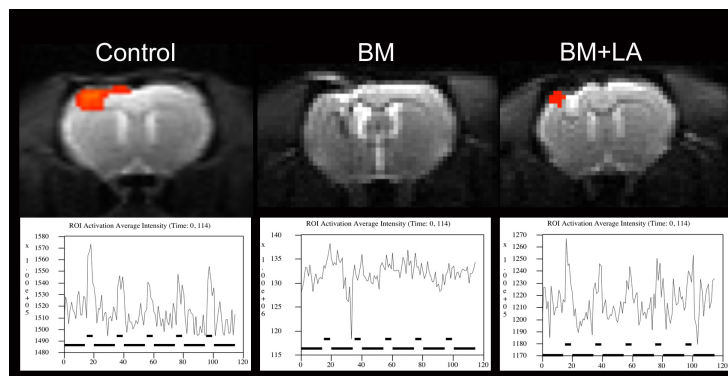


Figure 27. Images fMRI scans (top) and corresponding activation profile (bottom).

We found no activation inside the biomaterial in any case, however, we found BOLD activation close to the biomaterial in 50% of LA treated animals and 33% of untreated animals. Graphs represent activation profile of corresponding to the activation area (Figura 40 down). We observed then, a right activation in somatosensorial.

4. Discussion

One of the first findings herein is the description of three zones around the injured area 15 days after lesion. As described previously, there is a well-established glial scar (GS) followed by a degeneration zone (DZ) surrounding the cystic cavity (CC). Finally, a third unaffected zone named as intact zone (IZ) as part of the neural parenchyma (Figure 28.A). LA treatment for 7 days after lesion significantly diminished the GS 15 days after LA treatment. Instead, we observed a continuity of neural tissue named herein as regeneration zone (RZ) characterized by the presence of several blood vessels expanded through the RZ. This RZ expanded inside the CC and some glial cells and neurons with synaptic endings with large intercellular spaces were found filling the CC. This fact could be reasonably interpreted as a renewing process with cell death and proliferation (Figure 28.B).

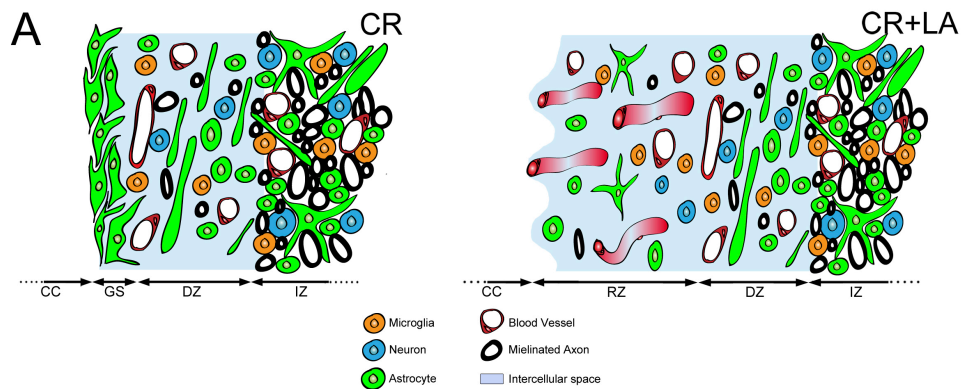


Figure 28. Illustration representing both injured area of non-treated animals (A) and LA treated animals (B). CC: cystic cavity; GS: glial scar; DZ: degeneration zone; IZ: intact zone; RZ: regeneration zone.

On the other hand, it has been reported that, after a brain injury, a large number of cells die. Because of this death, many neurotoxic chemicals are released into the extracellular medium, promoting an increase of ROS and triggering more apoptotic/necrosis processes (Kaur and Ling, 2008) and decreasing GSH levels as a consequence of oxidative stress. Many studies have reported the antioxidants properties of LA after a brain trauma (Packer et al., 1997, Lynch, 2001) increasing GSH production (Packer et al., 1995) and the BBBp recovery. In this study, an increase of the total antioxidant capacity was observed in the injured area after 7 days of treatment, indicating that LA was able to cross the BBB (Shay et al., 2009) and to act as an antioxidant in the brain (Annahazi et al., 2007). Moreover, LA was able not only recovering GSH levels but also stimulating the synthesis of GSH *de novo*, which decreases ROS formation after brain injury (Packer et al., 1997, Toklu et al., 2009). It has been reported that a decrease in ROS promotes cell survival (Silva and Coulinho, 2010). Recent studies suggest that LA works as a good

neuroprotectant by acting as an antioxidant and anti-inflammatory agent (Freitas, 2009, Toklu et al., 2009), and is able to switch the regulation of several genes linked to cell survival, inflammation and oxidative stress (Larghero et al., 2007). Therefore our present data agree with previous studies. Herein, we demonstrate that a treatment with LA for 7 days is able to decrease environmental ROS and to promote cell survival in the injured area after 15 days.

There are increasing evidences that inflammatory response in nerve trunks is important for axonal regeneration (Barrette et al., 2008) and also it is well known that the presence of microglia stimulates injured neurons to regenerate their axons (Lu and Richardson, 1991, Leon et al., 2000). BDNF is a trophic factor designated to play a central role in the CNS, as a neuroprotective agent (Schabitz et al., 1997, Wu, 2005) essential for brain plasticity stimulation (Bessis et al., 2007, Schabitz et al., 2007, Mattson, 2008). The important role of microglia in brain neuroplasticity stimulation may be due to BDNF production, which has been involved in learning, memory and neuroplasticity (Binder and Scharfman, 2004, Lipsky and Marini, 2007, Xia et al., 2010). Thus, BDNF is thought to promote the survival of young neurons originated in the SVZ (Pencea et al., 2001) and play a role as a trophic factor for neurons that have matured and are becoming integrated into functional circuits (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). Phosphorylated CREB is involved in the BDNF activation pathway. In this study we show an increase of both proteins after LA treatment. These data suggest the direct implication of LA in neural tissue regeneration processes and neural plasticity.

Recently, it has been studied some substances with antioxidant capacity such as Resveratrol, a natural stilbene present in grapes, whose administration has been reported to improve the TBI outcome probably by regulating VEGF and nitric oxide synthase (Tsai et al., 2007, Dong et al., 2008). It is also known that antioxidants, such as LA, help to reduce the permeability of the BBB and therefore cell damage, while maintaining the ionic balance of Ca^{2+} and Mg^{2+} in brain endothelial cells (Li et al., 2000, Rochette et al., 2013). In our study, it has been observed that LA is able to stimulate angiogenesis after brain injury. It has been also demonstrated blocking VEGF that LA is able to stimulate angiogenesis by itself.

Although astrocyte cell density was not significantly different between groups, it must be highlighted the especial glial distribution around the injured area. Animals that did not receive LA treatment presented a marked glial scar, delimiting the injured area fully insulate of the rest of the brain constituting an end to the regeneration of the injury. Astrocytes play an active role in maintaining the structure, metabolism and function of the brain (Barcia et al., 2008). In response to diverse brain injury astrocytes become hypertrophic; such astrocytes are also referred to as reactive and/or activated astrocytes (Bushong et al., 2004, Wilhelmsson et al., 2006, Chvatal et al., 2007). Reactive astrocytes are recognized through their increase in size and upregulation of glial fibrillar acidic protein (GFAP) expression and immunoreactivity (Faulkner et al., 2004, Das et al., 2012). In this sense, LA treatment did not showed a decrease in astrocytes number but did it in size, showing a reduction of area occupied by this glial cells. The reduction in the glial scar allows possibly the arrival of microglial cells, which are involved in remodelling processes.

In this work we have observed new astrocytes sharing the space close to the damage area with new blood vessels. Probably the presence of new blood vessels improved a local reperfusion and consequently cellular survival. Similar studies, demonstrate cell proliferation in subventricular zone (SVZ) and posterior migration of newborn cells to the injured area (Panigrahi et al., 1996, Yamashita et al., 2006, Kojima et al., 2010). In our work we cannot demonstrate that astrocytes and newborn cells have arrived from the SVZ, however we have shown evidences of proliferation and/or migration in the injured area.

In view of these results we can say that, the administration of LA is able to increase the antioxidant capacity of the environment, reduce glial scar, stimulate angiogenesis and promote neural tissue regeneration. As a consequence, neural tissue grew in the direction of the cystic cavity, new cells were produced and reorganized and this damage was reduced. However we don't know how much time would be necessary for a complete recovery of the injury and even if it could be possible. We therefore propose secondly strategy, the use of biomaterials as scaffolds to that end.

As seen above, brain injury causes immediately and delayed cell death, which involves the formation of a cavity delimited by a glial scar (Fitch et al., 1999, Rocamonde et al., 2012). It has been previously studied that placing a scaffold into the damaged area or cavity may provide support for the surrounding brain tissue, working as a substrate for cell growth, regeneration of axons and formation of neurites (Tsai et al., 2007, Veiga et al., 2011, Martinez-Ramos et al., 2012).

The strategies studied long ago on the regeneration of lesions in the PNS and CNS have not been very successful due to lack of knowledge about the mechanisms of injury in both systems (An et al., 2006, Das et al., 2012). Still, the size of the lesion is a very important limiting factor in the process of regeneration (Papadopoulos et al., 2002, Lakatos et al., 2003). To overcome this problem and favour the regeneration of neural tissue after CNS injury effort has been devoted to investigate the use of different types of polymeric scaffolds in the brain (Martinez-Ramos et al., 2012). Polymeric biomaterials are widely preferred as scaffolds for the regeneration of the peripheral nervous system (PNS) and central (CNS), both *in vivo* and *in vitro* (Bellamkonda et al., 1995, Schmidt and Leach, 2003, Subramanian et al., 2009, Veiga et al., 2011, Sur et al., 2012, Zhang et al., 2013). Scaffolds made of hyaluronic acid, poly(epsilon-caprolactone), poly(glycolic acid) or even polydimethylsiloxane have been employed in animal models of cortical damage (Hou et al., 2005, Zhang et al., 2007). A suitable scaffold for tissue engineering in the brain should support cell growth, maintain differentiated cell functions, be highly porous and be as compliant as the host tissue; the porosity facilitates the accommodation of many cells, (Woerly et al., 1999, Tian et al., 2005) enables a uniform distribution of the cells and the diffusion of oxygen and nutrients from host tissue, and must permit the neovascularization of the matrix if the cells inside it must survive (Martinez-Ramos et al., 2012).

In the second part of our study, we used a polymeric biomaterial composed by p(EA-co-HEA) in a ratio 90/10, which was successfully implanted near the SVZ and did not suffer any kind of rejection by the animal (Martinez-Ramos et al., 2012). Moreover, the combined use of this

biomaterial together with LA treatment for 7 days was able to promote colonization of the biomaterial by a large number of neural cells.

It has been previously described, that vascularization and local angiogenesis processes become crucial for neuroregeneration strategy (Morgan et al., 2007). In our study we found that the biomaterial provides a good environment for the growth of blood vessels within it and the combination with LA treatment promotes the formation of that blood vessels. Furthermore, it has been observed that blood vessels play an important role as guides in neural cell migration from the SVZ to the injured area (Kojima et al., 2010).

On the other hand, astrocytes are another important cell type for the formation of new tissue, which are related with blood vessel forming the BBB and provide support to the cells (Rohl et al., 2010). In our study, astroglial response initially suffered a significant increase in LA treated animals, but this declined thereafter, in contrast to a delayed response in untreated animals. It has been reported that, after a trauma, astrocytes release trophic factors that stimulate microglial activation, initiating repairing mechanism and promoting new neurites growing (Wang et al., 2007, Loov et al., 2012). Moreover, astrocytes supplied nutrients to the NS, such as glucogen and make the glucogenolysis induced by norepinephrine. This function is very important due to neurons are not able to restore energetic molecules (Lucas et al., 2006). Probably in our case, astrocytes suffer an initial activation and migration to the biomaterial to promote support to other cells.

Although there is currently an open question about the role of microglial cells, there is increasing evidence showing that, under certain circumstances, microglia may have a neuroprotective role (Neumann et al., 2006, Lalancette-Hebert M et al., 2007) and promote adult neurogenesis (Kim et al., 2009, Thored et al., 2009). Our studies showed that, there were not differences in the number of microglial cells (Iba1) in the presence or absence of LA, however, we found an statistical increase at 15 days in the number of macrophage cells (ED1) in untreated animals compared with LA treated animals. Maybe the explanation for the presence of macrophages in the biomaterial resides in the fact of LA absence that could stop the cascade of processes that activates microglial cells.

We have observed that the treatment with the stimulated the proliferation and migration to the biomaterial of a significant number of immature neurons (Tuj1). Likewise, we also found some mature neurons (MAP2) within the biomaterial with synaptic processes. Recent studies in this type of biomaterials showed good performance thereof as support for stem cells. It was observed that a large number of these cells were able to survive and differentiate into both neurons and glial cells with dendritic extensions (Veiga et al., 2011, Martinez-Ramos et al., 2012). Although we found some mature neurons within the biomaterial, we could not observe any activation using fMRI, this is probably because the number of neurons was not high enough and that these had not yet been able to establish the necessary connections to activation.

We conclude that the use of polymeric biomaterials formed by p(EA-co-HEA) 90/10 provides good support for the regeneration of damaged tissue. We have also seen that the use of LA treatment combined with biomaterial seems to favour neurons migrations that are able to grow

and mature inside the biomaterial. We do not know if these neurons in the future will be able to fully reconstruct the architecture of the cerebral cortex and much less if get reconnect the circuit.

The treatments for traumatic and degenerative brain diseases have traditionally had limited success outside of a few pharmacological agents capable of modifying disease symptoms. Today, however, advances in drug delivery and tissue engineering is opening opportunities that extend beyond the symptomatic relief and neuroprotection includes neurorepair (Xia et al., 2010). Furthermore, biomaterials are being used increasingly to promote endogenous regeneration. The successful development of biomaterials capable of effective brain protection, repair and regeneration requires a complex interaction between researchers and practitioners from diverse disciplines. The main reason for this lies in the complexity of the brain itself and the myriad of biochemical cellular responses associated with injury and repair (Orive et al., 2009). As such, the development of a meaningful understanding of how to rationally design biomaterials for brain repair will require significant advances in the development of new materials, along with a clear understanding of the types of brain injury, as well as a more refined understanding biological responses to TBI.



BIBLIOGRAFÍA

- Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS (2000) Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20:2896-2903.
- Agarwal R, Shukla GS (1999) Potential role of cerebral glutathione in the maintenance of blood-brain barrier integrity in rat. *Neurochem Res* 24:1507-1514.
- Akncbay H, Senel S, Ay ZY (2007) Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 80:290-296.
- Aloisi F (2001) Immune function of microglia. *Glia* 36:165-179.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629-634.
- Alvarez-Buylla A, Kirn JR (1997) Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds. *Journal of neurobiology* 33:585-601.
- Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F (2002) Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull* 57:751-758.
- Alvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebohm F (1990) Proliferation "hot spots" in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron* 5:101-109.
- An Y, Tsang KK, Zhang H (2006) Potential of stem cell based therapy and tissue engineering in the regeneration of the central nervous system. *Biomed Mater* 1:R38-44.
- Annahazi A, Mracsko E, Sule Z, Karg E, Penke B, Bari F, Farkas E (2007) Pre-treatment and post-treatment with alpha-tocopherol attenuates hippocampal neuronal damage in experimental cerebral hypoperfusion. *Eur J Pharmacol* 571:120-128.
- Arai T, Lundborg G, Dahlin LB (2000) Bioartificial nerve graft for bridging extended nerve defects in rat sciatic nerve based on resorbable guiding filaments. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 34:101-108.
- Arora DK, Cosgrave AS, Howard MR, Bubb V, Quinn JP, Thippeswamy T (2007) Evidence of postnatal neurogenesis in dorsal root ganglion: role of nitric oxide and neuronal restrictive silencer transcription factor. *J Mol Neurosci* 32:97-107.
- Atzei A, Calcagni M, Breda B, Fasolo G, Pajardi G, Cugola L (2007) Clinical evaluation of a hyaluronan-based gel following microsurgical reconstruction of peripheral nerves of the hand. *Microsurgery* 27:2-7.
- Babu GN, Kumar A, Singh RL (2010) Chronic pretreatment with acetyl-L-carnitine and DL-alpha-lipoic acid protects against acute glutamate-induced neurotoxicity in rat brain by altering mitochondrial function. *Neurotox Res* 19:319-329.

-
- Barcia C, Sanderson NS, Barrett RJ, Wawrowsky K, Kroeger KM, Puntel M, Liu C, Castro MG, Lowenstein PR (2008) T cells' immunological synapses induce polarization of brain astrocytes in vivo and in vitro: a novel astrocyte response mechanism to cellular injury. *PLoS One* 3:2977-3005.
- Barnea A, Nottebohm F (1994) Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11217-11221.
- Barrette B, Hebert MA, Filali M, Lafortune K, Vallieres N, Gowing G, Julien JP, Lacroix S (2008) Requirement of myeloid cells for axon regeneration. *J Neurosci* 28:9363-9376.
- Bear M, Connors B, Paradiso M (2007) *Neuroscience: exploring the brain*. United States of American: Lippincott Williams & Wilkins.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1620-1624.
- Bellamkonda R, Ranieri JP, Bouche N, Aebischer P (1995) Hydrogel-based three-dimensional matrix for neural cells. *Journal of biomedical materials research* 29:663-671.
- Bergstrom T, Forsberg-Nilsson K (2012) Neural stem cells: brain building blocks and beyond. *Upsala journal of medical sciences* 117:132-142.
- Bessis A, Bechade C, Bernard D, Roumier A (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55:233-238.
- Biewenga GP, Haenen GR, Bast A (1997) The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General pharmacology* 29:315-331.
- Binder DK, Scharfman HE (2004) Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22:123-131.
- Bourbon A, Vionnet M, Leprince P, Vaissier E, Copeland J, McDonagh P, Debre P, Gandjbakhch I (2004) The effect of methylprednisolone treatment on the cardiopulmonary bypass-induced systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg* 26:932-938.
- Bozoyan L, Khilghatyan J, Saghatelian A (2012) Astrocytes control the development of the migration-promoting vasculature scaffold in the postnatal brain via VEGF signaling. *J Neurosci* 32:1687-1704.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

- Brocchini S, James K, Tangpasuthadol V, Kohn J (1998) Structure-property correlations in a combinatorial library of degradable biomaterials. *J Biomed Mater Res* 42:66-75.
- Broeke J (2005).
- Brown MM, Wade JP, Marshall J (1985) Fundamental importance of arterial oxygen content in the regulation of cerebral blood flow in man. *Brain : a journal of neurology* 108 (Pt 1):81-93.
- Brown RA, Blunn GW, Ejim OS (1994) Preparation of orientated fibrous mats from fibronectin: composition and stability. *Biomaterials* 15:457-464.
- Buffo A, Rolando C, Ceruti S (2010) Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochemical pharmacology* 79:77-89.
- Bushong EA, Martone ME, Ellisman MH (2004) Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci* 22:73-86.
- Campillo-Fernandez AJ, Pastor S, Abad-Collado M, Bataille L, Gomez-Ribelles JL, Meseguer-Duenas JM, Monleon-Pradas M, Artola A, Alio JL, Ruiz-Moreno JM (2007) Future design of a new keratoprosthesis. Physical and biological analysis of polymeric substrates for epithelial cell growth. *Biomacromolecules* 8:2429-2436.
- Cao J, Xiao Z, Jin W, Chen B, Meng D, Ding W, Han S, Hou X, Zhu T, Yuan B, Wang J, Liang W, Dai J (2013) Induction of rat facial nerve regeneration by functional collagen scaffolds. *Biomaterials* 34:1302-1310.
- Carlen M, Meletis K, Goritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, Amendola M, Barnabe-Heider F, Yeung MS, Naldini L, Honjo T, Kokaia Z, Shupliakov O, Cassidy RM, Lindvall O, Frisen J (2009) Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci* 12:259-267.
- Cederberg D, Siesjo P (2010) What has inflammation to do with traumatic brain injury? *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery* 26:221-226.
- Chang CJ, Hsu SH, Yen HJ, Chang H, Hsu SK (2007) Effects of unidirectional permeability in asymmetric poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits on peripheral nerve regeneration: an in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 83:206-215.
- Chvatal A, Anderova M, Kirchhoff F (2007) Three-dimensional confocal morphometry - a new approach for studying dynamic changes in cell morphology in brain slices. *J Anat* 210:671-683.

-
- Circu ML, Aw TY (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48:749-762.
- Clapper JD, Iverson SL, Guymon CA (2007) Nanostructured biodegradable polymer networks using lyotropic liquid crystalline templates. *Biomacromolecules* 8:2104-2111.
- Clark WM, Rinker LG, Lessov NS, Lowery SL, Cipolla MJ (2001) Efficacy of antioxidant therapies in transient focal ischemia in mice. *Stroke* 32:1000-1004.
- Coligan JE (2003) *Current Protocols in Protein Science*.
- Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Preat V (2012) PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 161:505-522.
- Das M, Mohapatra S, Mohapatra SS (2012) New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 9:236.
- Datta K, Suman S, Kallakury BV, Fornace AJ, Jr. (2012) Exposure to heavy ion radiation induces persistent oxidative stress in mouse intestine. *PLoS One* 7:e42224.
- Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C (2002) *Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress*. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins.
- Dawson E, Mapili G, Erickson K, Taqvi S, Roy K (2008) Biomaterials for stem cell differentiation. *Advanced drug delivery reviews* 60:215-228.
- De la Fuente González A, Rodríguez Lozano J, Fonseca Capdevila E (2007) Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western blot). *Piel* 22:7.
- Del Rio D, Agnoli C, Pellegrini N, Krogh V, Brighenti F, Mazzeo T, Masala G, Bendinelli B, Berrino F, Sieri S, Tumino R, Rollo PC, Gallo V, Sacerdote C, Mattiello A, Chiodini P, Panico S (2011) Total antioxidant capacity of the diet is associated with lower risk of ischemic stroke in a large Italian cohort. *The Journal of nutrition* 141:118-123.
- Demopoulos HB, Flamm ES, Pietronigro DD, Seligman ML (1980) The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand Suppl* 492:91-119.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences* 22:391-397.

- Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL (1991) A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods* 39:253-262.
- Doetsch F, G-VJ, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-5052.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-5061.
- Dong W, Li N, Gao D, Zhen H, Zhang X, Li F (2008) Resveratrol attenuates ischemic brain damage in the delayed phase after stroke and induces messenger RNA and protein expression for angiogenic factors. *J Vasc Surg* 48:709-714.
- Dringen R (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62:649-671.
- Durrani AI, Schwartz H, Schmid W, Sontag G (2007) alpha-Lipoic acid in dietary supplements: development and comparison of HPLC-CEAD and HPLC-ESI-MS methods. *J Pharm Biomed Anal* 45:694-699.
- Ejim OS, Blunn GW, Brown RA (1993) Production of artificial-orientated mats and strands from plasma fibronectin: a morphological study. *Biomaterials* 14:743-748.
- Emmez H, Yildirim Z, Kale A, Tonge M, Durdag E, Borcek AO, Ucankus LN, Dogulu F, Kilic N, Baykaner MK (2010) Anti-apoptotic and neuroprotective effects of alpha-lipoic acid on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Acta Neurochir (Wien)* 152:1591-1600; discussion 1600-1591.
- Evans PH (1993) Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 49:577-587.
- Fahey RC, Buschbacher RM, Newton GL (1987) The evolution of glutathione metabolism in phototrophic microorganisms. *J Mol Evol* 25:81-88.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24:2143-2155.
- Fillebeen C, Pantopoulos K (2002) Redox control of iron regulatory proteins. *Redox Rep* 7:15-22.
- Fitch MT, Doller C, Combs CK, Landreth GE, Silver J (1999) Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. *J Neurosci* 19:8182-8198.

-
- Flentjar NJ, Crack PJ, Boyd R, Malin M, de Haan JB, Hertzog P, Kola I, Iannello R (2002) Mice lacking glutathione peroxidase-1 activity show increased TUNEL staining and an accelerated inflammatory response in brain following a cold-induced injury. *Exp Neurol* 177:9-20.
- Flier J, Van Muiswinkel FL, Jongenelen CA, Drukarch B (2002) The neuroprotective antioxidant alpha-lipoic acid induces detoxication enzymes in cultured astroglial cells. *Free Radic Res* 36:695-699.
- Font E, Desfilis E, Perez-Canellas MM, Garcia-Verdugo JM (2001) Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. *Brain, behavior and evolution* 58:276-295.
- Freitas RM (2009) The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. *Neurosci Lett* 455:140-144.
- Fridovich I (1983) Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 23:239-257.
- Fujimoto KL, Guan J, Oshima H, Sakai T, Wagner WR (2007) In vivo evaluation of a porous, elastic, biodegradable patch for reconstructive cardiac procedures. *Ann Thorac Surg* 83:648-654.
- Gabig TG, Babior BM (1979) The O₂(-) -forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme. *J Biol Chem* 254:9070-9074.
- Gaetz M (2004) The neurophysiology of brain injury. *Clin Neurophysiol* 115:4-18.
- Gandhi S, Abramov AY (2012) Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012:428010.
- Gao D, Zhang X, Jiang X, Peng Y, Huang W, Cheng G, Song L (2006) Resveratrol reduces the elevated level of MMP-9 induced by cerebral ischemia-reperfusion in mice. *Life Sci* 78:2564-2570.
- Gennarelli G (1997) The pathobiology of traumatic brain injury. *The Neuroscientist* 3:73-81.
- Georges PC, Janmey PA (2005) Cell type-specific response to growth on soft materials. *J Appl Physiol* 98:1547-1553.
- Georges PC, Miller WJ, Meaney DF, Sawyer ES, Janmey PA (2006) Matrices with compliance comparable to that of brain tissue select neuronal over glial growth in mixed cortical cultures. *Biophysical journal* 90:3012-3018.
- Ghanaati S, Udeabor SE, Barbeck M, Willershausen I, Kuenzel O, Sader RA, Kirkpatrick CJ (2013) Implantation of silicon dioxide-based nanocrystalline hydroxyapatite and pure phase beta-tricalciumphosphate bone substitute

- granules in caprine muscle tissue does not induce new bone formation. *Head & face medicine* 9:1.
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G (1996) Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257-267.
- Gonzalez-Perez O, Gonzalez-Castaneda RE, Huerta M, Luquin S, Gomez-Pinedo U, Sanchez-Almaraz E, Navarro-Ruiz A, Garcia-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. *Neurosci Lett* 321:100-104.
- Gonzalez-Perez O, Gonzalez-Castaneda RE, Huerta M, Luquin S, Gomez-Pinedo U, Sanchez-Almaraz E, Navarro-Ruiz A, Garcia-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. *Neurosci Lett* 321:100-104.
- Gonzalez-Perez O, Gutierrez-Fernandez F, Lopez-Virgen V, Collas-Aguilar J, Quinones-Hinojosa A, Garcia-Verdugo JM (2012) Immunological regulation of neurogenic niches in the adult brain. *Neuroscience* 226:270-281.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG (1999) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286:548-552.
- Graeber MB, Streit WJ (2010) Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:89-105.
- Gref R, Couvreur P, Barratt G, Mysiakine E (2003) Surface-engineered nanoparticles for multiple ligand coupling. *Biomaterials* 24:4529-4537.
- Gursoy-Ozdemir Y, Can A, Dalkara T (2004) Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. *Stroke* 35:1449-1453.
- Hall ED, Braugher JM (1989) Central nervous system trauma and stroke. II. Physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 6:303-313.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246:501-514.
- Hardy K, Hunt NH (2004) Effects of a redox-active agent on lymphocyte activation and early gene expression patterns. *Free Radic Biol Med* 37:1550-1563.
- Harrhill M (1997) Management of severe head injury: new document provides guidelines. *Brain Trauma Foundation* 23:282-284.
- Hashimoto T, Suzuki Y, Kitada M, Kataoka K, Wu S, Suzuki K, Endo K, Nishimura Y, Ide C (2002) Peripheral nerve regeneration through alginate gel: analysis

-
- of early outgrowth and late increase in diameter of regenerating axons. *Exp Brain Res* 146:356-368.
- Hatten ME (1999) Expansion of CNS precursor pools: a new role for Sonic Hedgehog. *Neuron* 22:2-3.
- Hayes RL, Galinat BJ, Kulkarne P, Becker DP (1983) Effects of naloxone on systemic and cerebral responses to experimental concussive brain injury in cats. *J Neurosurg* 58:720-728.
- Helfaer MA, Kirsch JR, Traystman RJ (1994) Radical scavengers: Penetration into brain following the ischemia and reperfusion. In: *Pharmacology of Cerebral Ischemia*(Kriegelstein, J. and Oberpichler-Schwenk, H., eds), pp 297-309: Medpharm Scientific.
- Henninger N, Dutzmann S, Sicard KM, Kollmar R, Bardutzky J, Schwab S (2005) Impaired spatial learning in a novel rat model of mild cerebral concussion injury. *Exp Neurol* 195:447-457.
- Heo JH, Han SW, Lee SK (2005) Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic Biol Med* 39:51-70.
- Hernandez-Ontiveros DG, Tajiri N, Acosta S, Giunta B, Tan J, Borlongan CV (2013) Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Frontiers in neurology* 4:30.
- Hou S, Xu Q, Tian W, Cui F, Cai Q, Ma J, Lee IS (2005) The repair of brain lesion by implantation of hyaluronic acid hydrogels modified with laminin. *Journal of neuroscience methods* 148:60-70.
- Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, Bechmann I, Becher B, Luhmann HJ, Waisman A, Kuhlmann CR (2010) Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J* 24:1023-1034.
- Ito Y, Hasuda H, Kamitakahara M, Ohtsuki C, Tanihara M, Kang IK, Kwon OH (2005) A composite of hydroxyapatite with electrospun biodegradable nanofibers as a tissue engineering material. *J Biosci Bioeng* 100:43-49.
- Jennett B (1972) Prognosis after severe head injury. *Clin Neurosurg* 19:200-206.
- Jennings JS, Gerber AM, Vallano ML (2008) Pharmacological strategies for neuroprotection in traumatic brain injury. *Mini Rev Med Chem* 8:689-701.
- Jeong HJ, Kim DW, Kim MJ, Woo SJ, Kim HR, Kim SM, Jo HS, Hwang HS, Kim DS, Cho SW, Won MH, Han KH, Park JS, Eum WS, Choi SY (2012) Protective effects of transduced Tat-DJ-1 protein against oxidative stress and ischemic brain injury. *Experimental & molecular medicine* 44:586-593.
- Jerison HJ (1970) Brain evolution: new light on old principles. *Science* 170:1224-1225.

- Jerison HJ (1977) The theory of encephalization. *Ann N Y Acad Sci* 299:146-160.
- Jones NC, Prior MJ, Burden-Teh E, Marsden CA, Morris PG, Murphy S (2005) Antagonism of the interleukin-1 receptor following traumatic brain injury in the mouse reduces the number of nitric oxide synthase-2-positive cells and improves anatomical and functional outcomes. *Eur J Neurosci* 22:72-78.
- Kaneko N, Sawamoto K (2009) Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions. *Neuroscience research* 63:155-164.
- Kang BC, Kang KS, Lee YS (2005) Biocompatibility and long-term toxicity of InnoPol implant, a biodegradable polymer scaffold. *Exp Anim* 54:37-52.
- Kas J, Blattna J (1986) Phospholipids in foodstuffs. *Acta Univ Carol Med (Praha)* 32:81-92.
- Kaur C, Ling EA (2008) Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system. *Curr Med Chem* 15:3068-3080.
- Keilhoff G, Stang F, Wolf G, Fansa H (2003) Bio-compatibility of type I/III collagen matrix for peripheral nerve reconstruction. *Biomaterials* 24:2779-2787.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Khabbazi T, Mahdavi R, Safa J, Pour-Abdollahi P (2012) Effects of alpha-lipoic acid supplementation on inflammation, oxidative stress, and serum lipid profile levels in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation* 22:244-250.
- Khan M, Im YB, Shunmugavel A, Gilg AG, Dhindsa RK, Singh AK, Singh I (2009) Administration of S-nitrosoglutathione after traumatic brain injury protects the neurovascular unit and reduces secondary injury in a rat model of controlled cortical impact. *J Neuroinflammation* 6:32.
- Kiernan AE, Steel KP (2000) Mouse homologues for human deafness. *Advances in oto-rhino-laryngology* 56:233-243.
- Kiernan J (2000) *El sistema nervioso humano: Mcgraw-Hill Interamericana*.
- Kim BJ, Kim MJ, Park JM, Lee SH, Kim YJ, Ryu S, Kim YH, Yoon BW (2009) Reduced neurogenesis after suppressed inflammation by minocycline in transient cerebral ischemia in rat. *J Neurol Sci* 279:70-75.
- Kim DH, Lilliehook C, Roides B, Chen Z, Chang M, Mobashery S, Goldman SA (2008) Testosterone-induced matrix metalloproteinase activation is a checkpoint for neuronal addition to the adult songbird brain. *J Neurosci* 28:208-216.

-
- Klatzo I, Piraux A, Laskowski EJ (1958) The relationship between edema, blood-brain-barrier and tissue elements in a local brain injury. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 17:548-564.
- Klementiev B, Novikova T, Korshunova I, Berezin V, Bock E (2008) The NCAM-derived P2 peptide facilitates recovery of cognitive and motor function and ameliorates neuropathology following traumatic brain injury. *Eur J Neurosci* 27:2885-2896.
- Kobold S, Hegewisch-Becker S, Oechsle K, Jordan K, Bokemeyer C, Atanackovic D (2009) Intraperitoneal VEGF inhibition using bevacizumab: a potential approach for the symptomatic treatment of malignant ascites? *Oncologist* 14:1242-1251.
- Koga T, Ishida T, Takeda T, Ishii Y, Uchi H, Tsukimori K, Yamamoto M, Himeno M, Furue M, Yamada H (2012) Restoration of dioxin-induced damage to fetal steroidogenesis and gonadotropin formation by maternal co-treatment with alpha-lipoic acid. *PLoS One* 7:e40322.
- Kojima T, Hirota Y, Ema M, Takahashi S, Miyoshi I, Okano H, Sawamoto K (2010) Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells* 28:545-554.
- Kokaia Z, Lindvall O (2003) Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol* 13:127-132.
- Kosower NS, Kosower EM (1978) The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* 54:109-160.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027-2033.
- Kuhn HG, Palmer TD, Fuchs E (2001) Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251:152-158.
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH (1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17:5820-5829.
- Kuijlen JM, de Haan BJ, Helfrich W, de Boer JF, Samplonius D, Mooij JJ, de Vos P (2006) The efficacy of alginate encapsulated CHO-K1 single chain-TRAIL producer cells in the treatment of brain tumors. *J Neurooncol* 78:31-39.
- Kumar S, Rao SL, Chandramouli BA, Pillai S (2013) Reduced contribution of executive functions in impaired working memory performance in mild traumatic brain injury patients. *Clinical neurology and neurosurgery*.

- Lakatos A, Barnett SC, Franklin RJ (2003) Olfactory ensheathing cells induce less host astrocyte response and chondroitin sulphate proteoglycan expression than Schwann cells following transplantation into adult CNS white matter. *Exp Neurol* 184:237-246.
- Lalancette-Hebert M, Growing G, A S, Weng YC, Kriz J (2007) Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci* 27:9.
- Larghero P, Vene R, Minghelli S, Travaini G, Morini M, Ferrari N, Pfeffer U, Noonan DM, Albin A, Benelli R (2007) Biological assays and genomic analysis reveal lipoic acid modulation of endothelial cell behavior and gene expression. *Carcinogenesis* 28:1008-1020.
- Lee J, Duan W, Mattson MP (2002) Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 82:1367-1375.
- Lee K, Silva EA, Mooney DJ (2011) Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J R Soc Interface* 8:153-170.
- Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI (2000) Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J Neurosci* 20:4615-4626.
- Li W, Busu C, Circu ML, Aw TY (2012) Glutathione in cerebral microvascular endothelial biology and pathobiology: implications for brain homeostasis. *International journal of cell biology* 2012:434971.
- Li W, Zheng T, Altura BT, Altura BM (2000) Antioxidants prevent elevation in $[Ca^{2+}]_i$ induced by low extracellular magnesium in cultured canine cerebral vascular smooth muscle cells: possible relationship to Mg^{2+} deficiency-induced vasospasm and stroke. *Brain Res Bull* 52:151-154.
- Limova M (2003) Evaluation of two calcium alginate dressings in the management of venous ulcers. *Ostomy Wound Manage* 49:26-33.
- Lindvall O, Kokaia Z (2006) Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 441:1094-1096.
- Lipsky RH, Marini AM (2007) Brain-derived neurotrophic factor in neuronal survival and behavior-related plasticity. *Ann NY Acad Sci* 1122:130-143.
- Liu W, Chen Q, Liu J, Liu KJ (2011) Normobaric hyperoxia protects the blood brain barrier through inhibiting Nox2 containing NADPH oxidase in ischemic stroke. *Medical gas research* 1:22.
- Livingston T, Ducheyne P, Garino J (2002) In vivo evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 62:1-13.

-
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7:179-193.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7:179-193.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2074-2077.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Loov C, Hillered L, Ebendal T, Erlandsson A (2012) Engulfing astrocytes protect neurons from contact-induced apoptosis following injury. *PLoS One* 7:e33090.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lu X, Richardson PM (1991) Inflammation near the nerve cell body enhances axonal regeneration. *J Neurosci* 11:972-978.
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM (2006) The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S232-240.
- Lyeth BG, Dixon CE, Hamm RJ, Jenkins LW, Young HF, Stonnington HH, Hayes RL (1988) Effects of anticholinergic treatment on transient behavioral suppression and physiological responses following concussive brain injury to the rat. *Brain Res* 448:88-97.
- Lynch MA (2001) Lipoic acid confers protection against oxidative injury in non-neuronal and neuronal tissue. *Nutr Neurosci* 4:419-438.
- Maegele M, Schaefer U (2008) Stem cell-based cellular replacement strategies following traumatic brain injury (TBI). *Minimally Invasive Therapy* 17:119-129.
- Marklund N, Bakshi A, Castelbuono DJ, Conte V, McIntosh TK (2006) Evaluation of pharmacological treatment strategies in traumatic brain injury. *Curr Pharm Des* 12:1645-1680.
- Martinez-Ramos C, Lainez S, Sancho F, Garcia Esparza MA, Planells-Cases R, Garcia Verdugo JM, Gomez Ribelles JL, Salmeron Sanchez M, Monleon Pradas M, Barcia JA, Soria JM (2008) Differentiation of postnatal neural stem cells into glia and functional neurons on laminin-coated polymeric substrates. *Tissue engineering Part A* 14:1365-1375.
- Martinez-Ramos C, Valles-Lluch A, Verdugo JM, Ribelles JL, Barcia Albacar JA, Orts AB, Soria Lopez JM, Pradas MM (2012) Channeled scaffolds

- implanted in adult rat brain. *Journal of biomedical materials research Part A* 100:3276-3286.
- Mattson MP (2008) Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann NY Acad Sci* 1144:97-112.
- McCord JM, Roy RS (1982) The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol* 60:1346-1352.
- Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52:711-760.
- Menei P, Montero-Menei C, Venier MC, Benoit JP (2005) Drug delivery into the brain using poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Expert Opin Drug Deliv* 2:363-376.
- Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A (2006) Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26:7907-7918.
- Methia N, Andre P, Hafezi-Moghadam A, Economopoulos M, Thomas KL, Wagner DD (2001) ApoE deficiency compromises the blood brain barrier especially after injury. *Mol Med* 7:810-815.
- Mikos AG, Bao Y, Cima LG, Ingber DE, Vacanti JP, Langer R (1993) Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *J Biomed Mater Res* 27:183-189.
- Ming GL, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223-250.
- Minghetti L (2005) Role of inflammation in neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol* 18:315-321.
- Mokry J, Karbanova J, Lukas J, Paleckova V, Dvorankova B (2000) Biocompatibility of HEMA copolymers designed for treatment of CNS diseases with polymer-encapsulated cells. *Biotechnol Prog* 16:897-904.
- Morgan R, Kreipke CW, Roberts G, Bagchi M, Rafols JA (2007) Neovascularization following traumatic brain injury: possible evidence for both angiogenesis and vasculogenesis. *Neurol Res* 29:375-381.
- Muehlschlegel S, Carandang R, Ouillette C, Hall W, Anderson F, Goldberg R (2013) Frequency and Impact of Intensive Care Unit Complications on Moderate-Severe Traumatic Brain Injury: Early Results of the Outcome Prognostication in Traumatic Brain Injury (OPTIMISM) Study. *Neurocritical care*.
- Murakami K, Kondo T, Yang G, Chen SF, Morita-Fujimura Y, Chan PH (1999) Cold injury in mice: a model to study mechanisms of brain edema and neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 57:289-299.

-
- Nadarajah B, Parnavelas JG (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3:423-432.
- Nag S (1996) Cold-injury of the cerebral cortex: immunolocalization of cellular proteins and blood-brain barrier permeability studies. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 55:880-888.
- Neumann H (2006) Microglia: a cellular vehicle for CNS gene therapy. *J Clin Invest* 116:2857-2860.
- Neumann J, Gunzer M, Gutzeit HO, Ullrich O, Reymann KG, Dinkel K (2006) Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB J* 20:714-716.
- Nieuwenhuys R (2009) El sistema nervioso central humano: Panamericana.
- Ninkovic MB, Malicevic ZM, Jelenkovic A, Dukic MM, Jovanovic MD, Stevanovic ID (2009) Nitric oxide synthase inhibitors partially inhibit oxidative stress development in the rat brain during sepsis provoked by cecal ligation and puncture. *General physiology and biophysics* 28 Spec No:243-250.
- Nitta SK, Numata K (2013) Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. *International journal of molecular sciences* 14:1629-1654.
- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Kriegstein AR (2008) Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol* 508:28-44.
- Nottebohm F (1985) Neuronal replacement in adulthood. *Ann N Y Acad Sci* 457:143-161.
- Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST (2006) A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* 26:13007-13016.
- Olesen SP (1987) Free oxygen radicals decrease electrical resistance of microvascular endothelium in brain. *Acta Physiol Scand* 129:181-187.
- Orive G, Anitua E, Pedraz JL, Emerich DF (2009) Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. *Nature reviews Neuroscience* 10:682-692.
- Otsuka M, Nakagawa H, Otsuka K, Ito A, Higuchi WI (2013) Effect of geometrical structure on the in vivo quality change of a three-dimensionally perforated porous bone cell scaffold made of apatite/collagen composite. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 101:338-345.
- Packer L, Tritschler HJ, Wessel K (1997) Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med* 22:359-378.
- Packer L, Witt EH, Tritschler HJ (1995) alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 19:227-250.

- Panigrahi M, Sadguna Y, Shivakumar BR, Kolluri SV, Roy S, Packer L, Ravindranath V (1996) alpha-Lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 717:184-188.
- Papadopoulos CM, Tsai SY, Alsbiei T, O'Brien TE, Schwab ME, Kartje GL (2002) Functional recovery and neuroanatomical plasticity following middle cerebral artery occlusion and IN-1 antibody treatment in the adult rat. *Ann Neurol* 51:433-441.
- Parathath SR, Parathath S, Tsirka SE (2006) Nitric oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood-brain barrier in tPA-dependent excitotoxic injury in mice. *J Cell Sci* 119:339-349.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: ed. Academic Press.
- Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB (2001) Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp Neurol* 172:1-16.
- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21:6706-6717.
- Penkowa M, Tio L, Giralt M, Quintana A, Molinero A, Atrian S, Vasak M, Hidalgo J (2006) Specificity and divergence in the neurobiologic effects of different metallothioneins after brain injury. *J Neurosci Res* 83:974-984.
- Perry VH, Lund RD (1989) Microglia in retinae transplanted to the central nervous system. *Neuroscience* 31:453-462.
- Peters MA (1975) Development of a "blood-brain barrier" to methadone in the newborn rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 192:513-520.
- Pitkänen A, Macintosh TK (2005) Animals model of posttraumatic epilepsy. *J Neurotrauma* 23:241-260.
- Prins ML, Hovda DA (2003) Developing experimental models to address traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma* 20:123-137.
- Pulsinelli W (1992) Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet* 339:533-536.
- Pun PB, Lu J, Mochhala S (2009) Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radic Res* 43:348-364.
- Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Gonzalez-Perez O, Garcia-Verdugo JM (2007) The human brain subventricular zone: stem cells in this niche and its organization. *Neurosurg Clin N Am* 18:15-20, vii.

-
- Quintana A, Giralt M, Molinero A, Campbell IL, Penkowa M, Hidalgo J (2007) Analysis of cerebral transcriptome in mice subjected to traumatic brain injury: importance of IL-6. *Neuromodulation* 40:139-143.
- Quintana A, Giralt M, Molinero A, Campbell IL, Penkowa M, Hidalgo J (2007) Analysis of the cerebral transcriptome in mice subjected to traumatic brain injury: importance of IL-6. *Neuroimmunomodulation* 14:139-143.
- Rakic P (2002) Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci* 22:614-618.
- Rakic P (2002) Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci* 22:614-618.
- Ramón y Cajal S (1988) Sobre las fibras nerviosas de la capa molecular del cerebelo *Revista trimestral de histología normal y patológica*.
- Raslan F, Albert-Weissenberger C, Ernestus RI, Kleinschnitz C, Siren AL (2012) Focal brain trauma in the cryogenic lesion model in mice. *Experimental & translational stroke medicine* 4:6.
- Rauhala P, Lin AM, Chiueh CC (1998) Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. *FASEB J* 12:165-173.
- Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW (1980) High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal Biochem* 106:55-62.
- Reed DJ, Fariss MW (1984) Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol Rev* 36:25S-33S.
- Retzius G (1894) Weitere Beiträge zur Kenntniss der Cajal'schen Zellen der Grosshirnrinde des Menschen. *Biologische Untersuchungen. Neue Folge* 6:29–36. *Neue Folge* 6:7.
- Ribak CE, Shapiro LA, Perez ZD, Spigelman I (2009) Microglia-associated granule cell death in the normal adult dentate gyrus. *Brain structure & function* 214:25-35.
- Robin AM, Zhang ZG, Wang L, Zhang RL, Katakowski M, Zhang L, Wang Y, Zhang C, Chopp M (2006) Stromal cell-derived factor 1 α mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:125-134.
- Rocamonde B, Paradells S, Barcia JM, Barcia C, Garcia Verdugo JM, Miranda M, Romero Gomez FJ, Soria JM (2012) Neuroprotection of lipoic acid treatment promotes angiogenesis and reduces the glial scar formation after brain injury. *Neuroscience* (in press).

- Rocamonde B, Paradells S, Barcia JM, Barcia C, Garcia Verdugo JM, Miranda M, Romero Gomez FJ, Soria JM (2012) Neuroprotection of lipoic acid treatment promotes angiogenesis and reduces the glial scar formation after brain injury. *Neuroscience* 224:102-115.
- Rochette L, Ghibu S, Richard C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C (2013) Direct and indirect antioxidant properties of alpha-lipoic acid and therapeutic potential. *Molecular nutrition & food research* 57:114-125.
- Rohl C, Armbrust E, Herbst E, Jess A, Gulden M, Maser E, Rimbach G, Bosch-Saadatmandi C (2010) Mechanisms involved in the modulation of astroglial resistance to oxidative stress induced by activated microglia: antioxidative systems, peroxide elimination, radical generation, lipid peroxidation. *Neurotox Res* 17:317-331.
- Saracino GA, Cigognini D, Silva D, Caprini A, Gelain F (2013) Nanomaterials design and tests for neural tissue engineering. *Chemical Society reviews* 42:225-262.
- Satriano JA, Shuldiner M, Hora K, Xing Y, Shan Z, Schlondorff D (1993) Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. *J Clin Invest* 92:1564-1571.
- Sauerbeck A, Gao J, Readnower R, Liu M, Pauly JR, Bing G, Sullivan PG (2011) Pioglitazone attenuates mitochondrial dysfunction, cognitive impairment, cortical tissue loss, and inflammation following traumatic brain injury. *Exp Neurol* 227:128-135.
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla A (2006) New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311:629-632.
- Schabitz WR, Schwab S, Spranger M, Hacke W (1997) Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:500-506.
- Schabitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, Schneider A, Kuhn HG (2007) Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke* 38:2165-2172.
- Schirmer L, Merkler D, König FB, Bruck W, Stadelmann C (2013) Neuroaxonal regeneration is more pronounced in early multiple sclerosis than in traumatic brain injury lesions. *Brain Pathol* 23:2-12.

-
- Schmidt CE, Leach JB (2003) Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annual review of biomedical engineering* 5:293-347.
- Schousboe A, Redburn DA (1995) Modulatory actions of gamma aminobutyric acid (GABA) on GABA type A receptor subunit expression and function. *J Neurosci Res* 41:1-7.
- Schouten JW (2007) Neuroprotection in traumatic brain injury: a complex struggle against the biology of nature. *Curr Opin Crit Care* 13:134-142.
- Schreibelt G, Musters RJ, Reijkerkerk A, de Groot LR, van der Pol SM, Hendrikx EM, Dopp ED, Dijkstra CD, Drukarch B, de Vries HE (2006) Lipoic acid affects cellular migration into the central nervous system and stabilizes blood-brain barrier integrity. *J Immunol* 177:2630-2637.
- Searls RL, Sanadi DR (1960) alpha-Ketoglutaric dehydrogenase. 8. Isolation and some properties of a flavoprotein component. *The Journal of biological chemistry* 235:2485-2491.
- Sena CM, Nunes E, Louro T, Proenca T, Fernandes R, Boarder MR, Seica RM (2008) Effects of alpha-lipoic acid on endothelial function in aged diabetic and high-fat fed rats. *Br J Pharmacol* 153:894-906.
- Seri B, Herrera DG, Gritti A, Ferron S, Collado L, Vescovi A, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2006) Composition and organization of the SCZ: a large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1:i103-111.
- Sharp DJ, Beckmann CF, Greenwood R, Kinnunen KM, Bonnelle V, De Boissezon X, Powell JH, Counsell SJ, Patel MC, Leech R (2011) Default mode network functional and structural connectivity after traumatic brain injury. *Brain : a journal of neurology* 134:2233-2247.
- Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM (2009) Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 1790:1149-1160.
- Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM (2009) Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 1790:1149-1160.
- Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S (2008) Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3:289-300.
- Sheridan WS, Duffy GP, Murphy BP (2012) Mechanical characterization of a customized decellularized scaffold for vascular tissue engineering. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 8:58-70.
- Shitaka Y, Tran HT, Bennett RE, Sanchez L, Levy MA, Dikranian K, Brody DL (2011) Repetitive closed-skull traumatic brain injury in mice causes

- persistent multifocal axonal injury and microglial reactivity. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 70:551-567.
- Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D, Friedman A (2010) Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nature reviews Neurology* 6:393-403.
- Siedlak SL, Casadesus G, Webber KM, Pappolla MA, Atwood CS, Smith MA, Perry G (2009) Chronic antioxidant therapy reduces oxidative stress in a mouse model of Alzheimer's disease. *Free Radic Res* 43:156-164.
- Sies H (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine* 91:31S-38S.
- Sies H, de Groot H (1992) Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicol Lett* 64-65 Spec No:547-551.
- Siesjo BK, Agardh CD, Bengtsson F (1989) Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1:165-211.
- Silva JP, Coultinho O (2010) Free radicals in regulation of damage and cell death: basic mechanisms and prevention. *Drugs Discoveries and Therapeutics* 4:144-166.
- Silva JP, Coutinho OP (2010) Free radicals in the regulation of damage and cell death - basic mechanisms and prevention. *Drug Discov Ther* 4:144-167.
- Sindhu RK, Ehdai A, Farmand F, Dhaliwal KK, Nguyen T, Zhan CD, Roberts CK, Vaziri ND (2005) Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. *Biochim Biophys Acta* 1743:86-92.
- Sinha K, Chaudhary G, Gupta YK (2002) Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci* 71:655-665.
- Soria JM, Martinez Ramos C, Bahamonde O, Garcia Cruz DM, Salmeron Sanchez M, Garcia Esparza MA, Casas C, Guzman M, Navarro X, Gomez Ribelles JL, Garcia Verdugo JM, Monleon Pradas M, Barcia JA (2007) Influence of the substrate's hydrophilicity on the in vitro Schwann cells viability. *J Biomed Mater Res A* 83:463-470.
- Soria JM, Martinez Ramos C, Salmeron Sanchez M, Benavent V, Campillo Fernandez A, Gomez Ribelles JL, Garcia Verdugo JM, Pradas MM, Barcia JA (2006) Survival and differentiation of embryonic neural explants on different biomaterials. *J Biomed Mater Res A* 79:495-502.
- Squire L, Berg D, Bloom F, du Lac S, Ghosh A, Spitzer N (2012) *Fundamental neuroscience*. USA: Elsevier.
- Stavropoulos A, Karring ES, Kostopoulos L, Karring T (2003) Deproteinized bovine bone and gentamicin as an adjunct to GTR in the treatment of intrabony

-
- defects: a randomized controlled clinical study. *J Clin Periodontol* 30:486-495.
- Stoll G, Jander S (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 58:233-247.
- Streit WJ, Kincaid-Colton CA (1995) The brain's immune system. *Scientific American* 273:54-55, 58-61.
- Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S (2009) Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *J Biomed Sci* 16:108.
- Sundback CA, Shyu JY, Wang Y, Faquin WC, Langer RS, Vacanti JP, Hadlock TA (2005) Biocompatibility analysis of poly(glycerol sebacate) as a nerve guide material. *Biomaterials* 26:5454-5464.
- Sur S, Pashuck ET, Guler MO, Ito M, Stupp SI, Launey T (2012) A hybrid nanofiber matrix to control the survival and maturation of brain neurons. *Biomaterials* 33:545-555.
- Suri D, Veenit V, Sarkar A, Thiagarajan D, Kumar A, Nestler EJ, Galande S, Vaidya VA (2012) Early Stress Evokes Age-Dependent Biphasic Changes in Hippocampal Neurogenesis, Bdnf Expression, and Cognition. *Biological psychiatry*.
- Svensk AM, Soini Y, Paakko P, Hiravikoski P, Kinnula VL (2004) Differential expression of superoxide dismutases in lung cancer. *Am J Clin Pathol* 122:395-404.
- Szentagothai J (1983) The modular architectonic principle of neural centers. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 98:11-61.
- Takeda K, Sakai N, Shiba H, Nagahara T, Fujita T, Kajiya M, Iwata T, Matsuda S, Kawahara K, Kawaguchi H, Kurihara H (2011) Characteristics of high-molecular-weight hyaluronic acid as a brain-derived neurotrophic factor scaffold in periodontal tissue regeneration. *Tissue engineering Part A* 17:955-967.
- Tamas A, Reglodi D, Farkas O, Kovessi E, Pal J, Povlishock JT, Schwarcz A, Czeiter E, Szanto Z, Doczi T, Buki A, Bukovics P (2012) Effect of PACAP in Central and Peripheral Nerve Injuries. *International journal of molecular sciences* 13:8430-8448.
- Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM, Doetsch F (2008) A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3:279-288.
- Teng H, Zhang ZG, Wang L, Zhang RL, Zhang L, Morris D, Gregg SR, Wu Z, Jiang A, Lu M, Zlokovic BV, Chopp M (2008) Coupling of angiogenesis and

- neurogenesis in cultured endothelial cells and neural progenitor cells after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:764-771.
- Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Leker RR (2010) Vascular endothelial growth factor increases neurogenesis after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:1008-1016.
- Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O (2006) Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 24:739-747.
- Thored P, Heldmann U, Gomes-Leal W, Gisler R, Darsalia V, Taneera J, Nygren JM, Jacobsen SE, Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O (2009) Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia* 57:835-849.
- Thored P, Wood J, Arvidsson A, Cammenga J, Kokaia Z, Lindvall O (2007) Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* 38:3032-3039.
- Tian WM, Hou SP, Ma J, Zhang CL, Xu QY, Lee IS, Li HD, Spector M, Cui FZ (2005) Hyaluronic acid-poly-D-lysine-based three-dimensional hydrogel for traumatic brain injury. *Tissue Eng* 11:513-525.
- Toba T, Nakamura T, Shimizu Y, Matsumoto K, Ohnishi K, Fukuda S, Yoshitani M, Ueda H, Hori Y, Endo K (2001) Regeneration of canine peroneal nerve with the use of a polyglycolic acid-collagen tube filled with laminin-soaked collagen sponge: a comparative study of collagen sponge and collagen fibers as filling materials for nerve conduits. *Journal of biomedical materials research* 58:622-630.
- Toklu HZ, Hakan T, Biber N, Solakoglu S, Ogunc AV, Sener G (2009) The protective effect of alpha lipoic acid against traumatic brain injury in rats. *Free Radic Res* 43:658-667.
- Trush MA, Mimnaugh EG, Gram TE (1982) Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmacol* 31:3335-3346.
- Tsai EC, Dalton PD, Shoichet MS, Tator CH (2004) Synthetic hydrogel guidance channels facilitate regeneration of adult rat brainstem motor axons after complete spinal cord transection. *J Neurotrauma* 21:789-804.
- Tsai SK, Hung LM, Fu YT, Cheng H, Nien MW, Liu HY, Zhang FB, Huang SS (2007) Resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats. *J Vasc Surg* 46:346-353.

-
- Tsai SK, Hung LM, Fu YT, Cheng H, Nien MW, Liu HY, Zhang FB, Huang SS (2007) Resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats. *J Vasc Surg* 46:346-353.
- Tsapanos VS, Stathopoulou LP, Papathanassopoulou VS, Tzingounis VA (2002) The role of Seprafilm bioresorbable membrane in the prevention and therapy of endometrial synechiae. *J Biomed Mater Res* 63:10-14.
- Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL (2004) Edema and brain trauma. *Neuroscience* 129:1021-1029.
- Uttagawa A, Truettner JS, Dietrich WD, Bramlett HM (2008) Systemic inflammation exacerbates behavioral and histopathological consequences of isolated traumatic brain injury in rats. *Exp Neurol* 211:283-291.
- Valverde F (2002) [Structure of the cerebral cortex. Intrinsic organization and comparative analysis of the neocortex]. *Revista de neurologia* 34:758-780.
- van Rossum D, Hanisch UK (2004) Microglia. *Metab Brain Dis* 19:393-411.
- Veiga DD, Antunes JC, Gomez RG, Mano JF, Ribelles JL, Soria JM (2011) Three-dimensional scaffolds as a model system for neural and endothelial 'in vitro' culture. *Journal of biomaterials applications* 26:293-310.
- Von Economo K (2007) Atlas of cytoarchitectonics of the adult human cerebral cortex: Karger AG.
- Wan Y, Wang Y, Liu Z, Qu X, Han B, Bei J, Wang S (2005) Adhesion and proliferation of OCT-1 osteoblast-like cells on micro- and nano-scale topography structured poly(L-lactide). *Biomaterials* 26:4453-4459.
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007) The inflammatory response in stroke. *Journal of neuroimmunology* 184:53-68.
- Watson BD (1993) Evaluation of the concomitance of lipid peroxidation in experimental models of cerebral ischemia and stroke. *Progress in brain research* 96:69-95.
- Weber R, Ramos-Cabrera P, Wiedermann D, van Camp N, Hoehn M (2006) A fully noninvasive and robust experimental protocol for longitudinal fMRI studies in the rat. *Neuroimage* 29:1303-1310.
- Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC (2009) Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 108:1343-1359.
- Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V, Terada M, Ellisman MH, Pekny M (2006) Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17513-17518.

- Wilkins HM, Kirchhof D, Manning E, Joseph JW, Linseman DA (2013) Mitochondrial Glutathione Transport is a Key Determinant of Neuronal Susceptibility to Oxidative and Nitrosative Stress. *J Biol Chem*.
- Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE (2007) Approaches to neural tissue engineering using scaffolds for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 59:325-338.
- Williams AJ, Hartings JA, Lu XC, Rolli ML, Dave JR, Tortella FC (2005) Characterization of a new rat model of penetrating ballistic brain injury. *J Neurotrauma* 22:313-331.
- Wills S, Rossi CC, Bennett J, Martinez Cerdeno V, Ashwood P, Amaral DG, Van de Water J (2011) Further characterization of autoantibodies to GABAergic neurons in the central nervous system produced by a subset of children with autism. *Molecular autism* 2:5.
- Winyard P, Morris C, Winrow V, Ziaidi M, Blake D (1994) Free radical pathways in the inflammatory response. *Elsevier Science* 361-383.
- Woerly S, Petrov P, Sykova E, Roitbak T, Simonova Z, Harvey AR (1999) Neural tissue formation within porous hydrogels implanted in brain and spinal cord lesions: ultrastructural, immunohistochemical, and diffusion studies. *Tissue Eng* 5:467-488.
- Wong DY, Hollister SJ, Krebsbach PH, Nosrat C (2007) Poly(epsilon-caprolactone) and poly(L-lactic-co-glycolic acid) degradable polymer sponges attenuate astrocyte response and lesion growth in acute traumatic brain injury. *Tissue Eng* 13:2515-2523.
- Wu D (2005) Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins. *NeuroRx* 2:120-128.
- Xia W, Han J, Huang G, Ying W (2010) Inflammation in ischaemic brain injury: current advances and future perspectives. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 37:253-258.
- Xie YT, Du YZ, Yuan H, Hu FQ (2012) Brain-targeting study of stearic acid-grafted chitosan micelle drug-delivery system. *Int J Nanomedicine* 7:3235-3244.
- Xu C, Yang F, Wang S, Ramakrishna S (2004) In vitro study of human vascular endothelial cell function on materials with various surface roughness. *J Biomed Mater Res A* 71:154-161.
- Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P, Garcia-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H, Sawamoto K (2006) Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 26:6627-6636.

-
- Yeo A, Rai B, Sju E, Cheong JJ, Teoh SH (2008) The degradation profile of novel, bioresorbable PCL-TCP scaffolds: an in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res A* 84:208-218.
- Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y (2007) A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science* 317:1722-1726.
- Young TH, Hung CH (2005) Behavior of embryonic rat cerebral cortical stem cells on the PVA and EVAL substrates. *Biomaterials* 26:4291-4299.
- Yukido I, Long MD (1990) The molecular basic of brain injury and brain edema. The role of oxygen free radicals. *Neurosurg* 27:1-9.
- Yusong P, Qianqian S, Chengling P, Jing W (2013) Prediction of mechanical properties of multilayer gradient hydroxyapatite reinforced poly(vinyl alcohol) gel biomaterial. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*.
- Zhang H, Hayashi T, Tsuru K, Deguchi K, Nagahara M, Hayakawa S, Nagai M, Kamiya T, Osaka A, Abe K (2007) Vascular endothelial growth factor promotes brain tissue regeneration with a novel biomaterial polydimethylsiloxane-tetraethoxysilane. *Brain research* 1132:29-35.
- Zhang QG, Laird MD, Han D, Nguyen K, Scott E, Dong Y, Dhandapani KM, Brann DW (2012) Critical role of NADPH oxidase in neuronal oxidative damage and microglia activation following traumatic brain injury. *PLoS One* 7:e34504.
- Zhang RL, Zhang ZG, Wang Y, LeTourneau Y, Liu XS, Zhang X, Gregg SR, Wang L, Chopp M (2007) Stroke induces ependymal cell transformation into radial glia in the subventricular zone of the adult rodent brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1201-1212.
- Zhang W, Chen J, Tao J, Jiang Y, Hu C, Huang L, Ji J, Ouyang HW (2013) The use of type 1 collagen scaffold containing stromal cell-derived factor-1 to create a matrix environment conducive to partial-thickness cartilage defects repair. *Biomaterials* 34:713-723.
- Ziebell JM, Bye N, Semple BD, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC (2011) Attenuated neurological deficit, cell death and lesion volume in Fas-mutant mice is associated with altered neuroinflammation following traumatic brain injury. *Brain Res* 1414:94-105.
- Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC (2010) Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 7:22-30.

- Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, Davisson RL (2002) Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* 91:1038-1045.
- Zohar O, Schreiber S, Getslev V, Schwartz JP, Mullins PG, Pick CG (2003) Closed-head minimal traumatic brain injury produces long-term cognitive deficits in mice. *Neuroscience* 118:949-955.

ANEXO I
