

UN NUEVO MODELO DE LA CICATRIZACIÓN DE LA DURAMADRE HUMANA: DEFINIENDO LAS BASES BIOLÓGICAS DEL CIERRE DURAL

Premio Póster 43° Congreso Argentino de Neurocirugía

Ezequiel Goldschmidt^{1*}, Santiago Hem¹, Marcelo Ielpi², Mónica Loresi²,
Antonio Carrizo¹, Pablo Argibay²

¹Servicio de Neurocirugía, Hospital Italiano de Buenos Aires. ²Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental (ICBME), Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

Objetivo. Desarrollar un modelo de cicatrización de la duramadre humana *in vitro*.

Material y método. Las muestras de tejido de duramadre humana se obtuvieron de cirugías para tratar meningiomas en las que la lesión se reseccó junto con un margen dural normal. En todos los casos se obtuvo consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el comité de ética del hospital. Las muestras fueron sembradas en placas de Petri y cultivadas con medio de cultivo y suero fetal bovino al 10%. El cultivo fue caracterizado con técnicas de tinción habitual e inmunofluorescencia indirecta. Se realizó una curva de proliferación celular para células que crecieron desde el explanto de duramadre y para células en cultivo primario.

Resultados. Se obtuvo crecimiento celular en todos los pacientes entre los días 3 y 5. Las células presentaron características morfológicas de fibroblastos y fueron positivas para marcadores de dicha estirpe (desmina y vimentina). Tanto los cultivos de explanto como el cultivo primario alcanzaron confluencia del 100% a los cinco días.

Conclusión. Se desarrolló el primer cultivo primario de duramadre humana descripto hasta el momento. Creemos que este modelo permitirá conocer las bases biológicas que participan en la cicatrización dural, los factores que influyen en la misma y el comportamiento de las diferentes plásticas durales.

Palabras clave: cultivo de células, duramadre, regeneración dural

INTRODUCCIÓN

Desde 1927 cuando Dandy utilizó por primera vez fascia lata para reconstituir un defecto dural surgieron muchos sustitutos de origen biológico y artificial para solucionar las soluciones de continuidad en la duramadre. Sin embargo poco se sabe sobre la biología normal de la cicatrización de la duramadre y sobre los factores que influyen en este fenómeno.

La duramadre es una de las tres meninges que recubren al encéfalo, es la cubierta más externa y la de mayor resistencia. Se trata de una membrana de 1 a 2 mm de espesor compuesta fundamentalmente por fibras de colágeno que se disponen formando 5 capas. Entre las fibras de colágeno se encuentran islas de fibroblastos y fibrocitos que son los responsables de la formación y el mantenimiento de la matriz extracelular. Hacia el espacio subdural presenta un epitelio discontinuo.

La durtomía es el primer paso intracraneano para acceder al cerebro, durante la cirugía la duramadre se retrae hacia afuera del campo quirúrgico cuidándola de la excesiva tensión y manteniéndola adecuadamente irrigada para preservar la vitalidad y evitar la retracción.

Luego de culminado el tiempo intracraneano, la duramadre es la única meninge que se cierra; el objetivo es conseguir un cierre hermético que permita la correcta cicatrización evitando la persistencia de soluciones de continuidad o cierres a tensión. El correcto cierre dural y posterior cicatrización es el paso más importante para evitar una de las complicaciones más frecuentes de la neurocirugía: las fistulas de líquido cefalorraquídeo

(LCR). El paso de LCR a través de una duramadre que no cierra de forma correcta se asocia a meningitis posquirúrgicas, mala cicatrización del resto de los tejidos que protegen al cerebro y neumoencéfalo¹. De hecho, muchos de los pacientes que presentan fistulas de LCR requieren una re intervención para cerrar el defecto. La incidencia de esta complicación luego de un abordaje de la base craneana puede llegar al 20%^{2,3}.

Leonietti et al en una revisión de 589 cirugías transitorales encontraron una incidencia de fistulas del 6%, de estos 35 pacientes 3 presentaron meningitis siendo las fistulas de LCR responsables del 50% de los pacientes con meningitis de la serie. De estos pacientes 16 requirieron una nueva intervención para cerrar la brecha². En otra serie de más de 500 pacientes la incidencia fue de 6,7%⁴.

Hasta el momento los esfuerzos para solucionar las alteraciones del cierre dural pasan por el diseño de membranas artificiales o biológicas que son, luego, reemplazadas por tejido normal y soluciones viscosas de fibrina que rellenan defectos de la duramadre y también contribuirían al cierre. A pesar de su uso extendido no es infrecuente que estos dispositivos sean insuficientes para contener el LCR y el mecanismo exacto por el cual el tejido normal reemplaza estas prótesis es desconocido⁴⁻⁶. Sin embargo, poco se sabe sobre cuáles son los mecanismos normales de la cicatrización dural, qué fenómenos de proliferación o migración celular participan y qué factores pueden estimularla o inhibirla. Tampoco sabemos cómo y por qué las plásticas durales son reemplazadas por duramadre y si existe diferencia en el comportamiento de los fibroblastos durales ante diferentes injertos autólogos como pericráneo, grasa, músculo o fascia lata. De la misma manera el cierre con productos como el Spongostan TM o el Surgicell TM no

fue evaluado en cuanto a su potencial efecto benéfico (o deletéreo) sobre el cierre.

El conocimiento sobre cuáles son los mecanismos que llevan al cierre definitivo de la duramadre, qué factores lo estimulan y qué factores lo inhiben puede permitir modificar la terapéutica postoperatoria y contribuir al diseño de tecnologías que permitan acelerar este proceso.

Dado que las fistulas de LCR son un problema prevalente en la neurocirugía asociadas a un aumento de la morbimortalidad de los pacientes y a la falta de conocimiento sobre los mecanismos biológicos implicados en el cierre dural nos proponemos identificar y caracterizar los principales procesos que permiten la cicatrización de la duramadre humana.

Con tal objetivo diseñamos y llevamos a cabo un modelo de cierre de duramadre humana *in vitro* para caracterizar el proceso de cicatrización dural. Al día de hoy este es el primer modelo de cultivo de fibroblastos derales humanos y creemos que puede servir para hechar luz sobre los aspectos mencionados.

En este trabajo describiremos el modelo de crecimiento y migración celular con una caracterización completa de las células en cultivo.

MATERIAL Y MÉTODO

Toma de muestras y fraccionamiento

La duramadre se obtuvo de neurocirugías en donde se debió resecar un fragmento de duramadre sana. En todos los casos el tejido provino de pacientes operados de meningiomas. En ningún caso se modificó la terapéutica o la técnica quirúrgica para la toma de muestra. Sólo se tomaron muestras de tejido sano resecado con fines terapéuticos que no complicó ni modificó de ninguna manera el tratamiento habitual ni los procedimientos diagnósticos. Se obtuvo en todos los casos consentimiento informado.

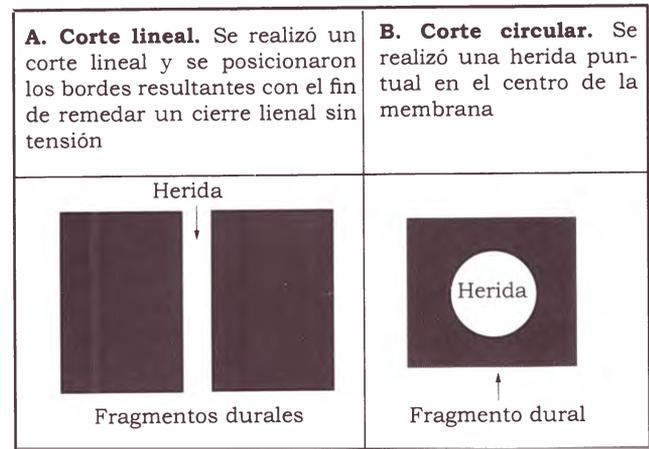
Luego de resecar el fragmento de duramadre sana se lo colocó en solución fisiológica y fue llevado al laboratorio. Las muestras se colocaron en solución salina estéril y posteriormente fueron fraccionadas en fragmentos 5 x 5 mm con técnica estéril. Se sembraron dentro de las 24 horas de tomada la muestra como se describe a continuación.

Cultivo primario de duramadre humana

En el laboratorio se colocaron fragmentos de dura de 5 x 5 mm en placas de Petri en el medio esencial de Dulbecco (D-MEM) conteniendo 10% de suero fetal bovino adicionado con alfa glutamina. Se incubaron a 37° con temperatura constante en un ambiente húmedo con 5% de dióxido de carbono.

Se utilizó la técnica de explanto. En el laboratorio se colocaron fragmentos de dura de 5 x 5 mm en placas de Petri se agregó medio de cultivo D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de antibiótico/antimicótico y 1% de L-glutamina.

Para la evaluación de la cicatrización se utilizaron 2 tipos de corte en el explanto de duramadre que se realizaron inmediatamente antes de la siembra, como se muestra en la figura 1.



Además se realizaron subcultivos con las células migradas de los explantos que también fue caracterizado. Ambos fueron evaluados con el microscopio invertido de contraste de fase para de identificar la morfología celular y realizar un conteo diario.

Histología e inmunohistoquímica

En el presente estudio se examinaron las células obtenidas en cultivo con necroscopía de campo claro para lo que se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina y técnica de PAS y luego se las inmunomarcó para la observación de dos filamentos intermedios Vimentina y Desmina presentes en fibroblastos con microscopía de epifluorescencia. Para ello se siguió el siguiente protocolo: Se fijaron con paraformaldehído al 4% por diez minutos luego de los cuales se lavaron con fosfato buffer salino (PBS) pH 7,2, se permeabilizaron las células con PBS-tritonX100 por diez minutos más y luego se las incubó con POWERBLOCK T.M. BIOGENEX durante 5 minutos para el bloqueo de sitios inespecíficos, seguidamente se incubó el anticuerpo primario toda la noche a 4° en cámara húmeda. Al día siguiente se lavan con PBS y se procede a realizar las incubaciones con el anticuerpo secundario biotinilado media hora a temperatura ambiente MULTILINK T.M. BIOGENEX y luego con estreptavidina fluoresceína (FITC) VECTOR LABS. por una hora a temperatura ambiente luego de lo cual se lavan con PBS pH 8.2 se montan y se procede a su observación en el microscopio Nikon Eclipse E400.

Ámbito

El estudio se llevó a cabo en el Servicio de Neurocirugía del Hospital Italiano de Buenos Aires (HIBA). Todos los cultivos celulares y el procesamiento de las muestras se realizaron en el Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del HIBA.

Población

Se incluyeron pacientes con indicación inequívoca de cirugías que requieran resección de fragmentos de duramadre que usualmente se descarta y no se utiliza con fines diagnósticos ni terapéuticos.

Criterios de inclusión

Pacientes adultos con indicación inequívoca de neurocirugía que requieran resección de fragmentos de duramadre que usualmente se descarta y no se utiliza con fines diagnósticos o terapéuticos operados en el HIBA

Criterios de exclusión

- Negativa a participar o al proceso de consentimiento informado
- Tratamiento previo con corticoides
- Patología que afecte la duramadre que se va a usar para cultivo
- Infecciones que afecten al espacio extra o subdural
- Pacientes con heridas penetrantes

Consideraciones éticas

La participación del estudio fue en todos los casos voluntaria y certificada por el proceso de consentimiento informado. Dado que se obtuvieron muestras rutinariamente descartadas y que la participación del paciente en el estudio no conlleva riesgos para éste se plantea un consentimiento oral. El estudio se llevó a cabo en total acuerdo con la normativa nacional e internacional vigente: Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, Disposición 5330/07 de ANMAT, y las Normas de Buenas Prácticas Clínicas ICH E6^{11,12}.

Se trata de un estudio observacional que no implica ningún riesgo adicional para el paciente. El material que se utilizó para el estudio (duramadre humana), es material que, en las cirugías en las que se obtuvo, rutinariamente se descarta sin utilizarse para procedimientos terapéuticos o diagnósticos. La utilización de este material no conlleva ningún riesgo adicional para el paciente ni modifica la técnica quirúrgica.

Todos los datos del estudio serán tratados con máxima confidencialidad de manera anónima, con acceso restringido sólo para el personal autorizado a los fines del estudio de acuerdo con la normativa legal vigente Ley Nacional de Protección de Datos Personales 25.326 (Ley de Habeas data)¹³.

RESULTADOS

Caracterización celular

A los 3-5 días las cuatro muestras tomadas presentaron crecimiento celular, inicialmente aparecieron células dispersas en el borde dural y que luego confluyeron en forma radial tomando la forma ahusada

característica. Las células son alargadas, fusiformes y emiten pseudópodos en varias direcciones. Una vez teñidas muestran un núcleo con nucléolos evidentes y un citoplasma eosinófilo y fibrilar. (Fig. 2)

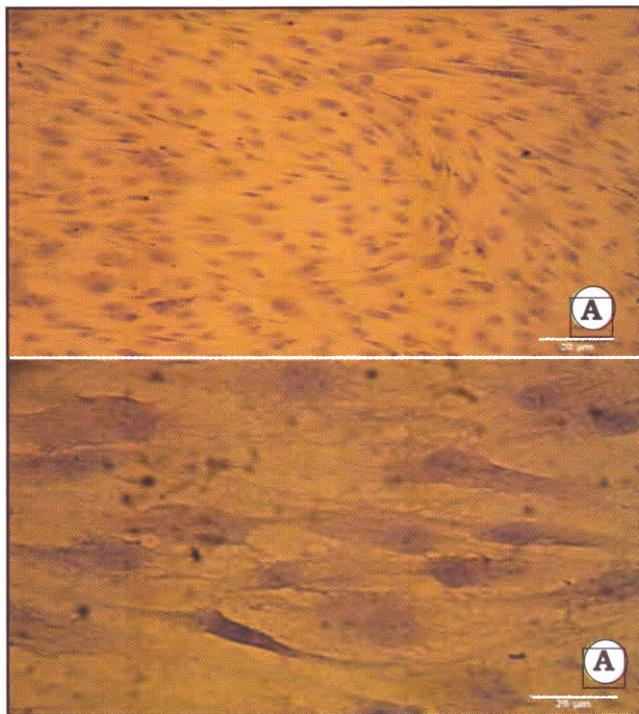


Fig. 2. Fibroblastos de cultivo de explanto. Se ven células dispuestas en forma radial, ahusadas, con un núcleo, nucléolos y citoplasma acidófilo y fibrilar. Día 5 postsiembra. A, 10 X; B, 40X.

La marcación con desmina y vimentina resultó intensamente positiva para el citoplasma marcando los filamentos intermedios y negativa en el núcleo, el control blanco con PBS no mostró fluorescencia. (Fig. 3)

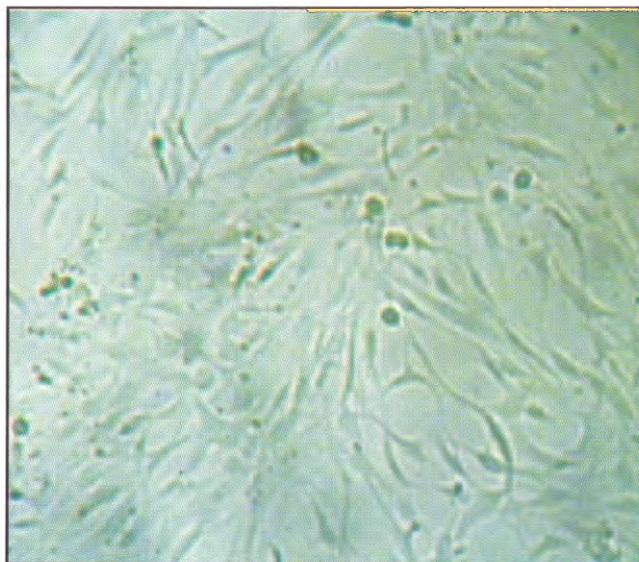


Fig. 3. Células en cultivo observadas con microscopio invertido de contraste de fase. Al día 5 las células ocupan toda la placa y no se observa más desarrollo celular

Dadas las características morfológicas, de tinción y la positividad de la inmunohistoquímica concluimos que las células en cultivo son fibroblastos, resultado que está en acuerdo con lo esperado y coincide con publicaciones previas.

Cultivo de explanto

En todos los casos hubo crecimiento celular, de acuerdo a publicaciones previas las placas de Petri fueron tratadas con colágeno previo a la siembra, sin embargo los controles crecieron en iguales condiciones sin añadir cubierta alguna por lo cual continuamos los cultivos con placas sin tratar. Éste hecho constituye una novedad puesto que en los modelos animales la adición de colágeno sí resultó fundamental para el crecimiento celular. Tanto el modelo de explanto 1 como en el 2, las células alcanzaron a cubrir el defecto (confluencia del 100%) a los 5 días.

En el primer día de crecimiento (3 a 5 días postsiembra) las células aparecieron en el borde del explanto de forma aislada, los días siguientes se observó migración hacia el centro del defecto hasta que éste fue completamente cubierto al quinto día. (Fig. 4).

Cultivo primario

Las células migradas desde el explanto fueron levantadas con una solución de tripsina al 0,25 %, centrifugadas a 1200 revoluciones por minuto durante 10 minutos y luego resuspendidas en medio de cultivo. Una vez contadas se sembraron 10.000 células en placas de 30 mm con 2 ml de medio de cultivo y se observó el crecimiento a los 2, 4 y 6 días cada día fijando una placa y tiñéndola con Hematoxilina y Eosina para facilitar la identificación celular. La curva de crecimiento se muestra en el gráfico 1.

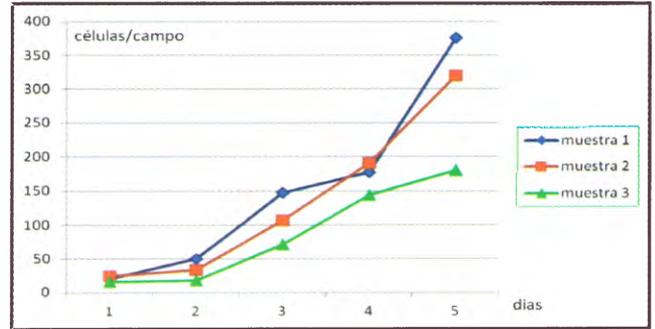


Gráfico 1. Curva de proliferación diaria de cultivo de explanto. El día 1 es el primer día en el que se observa crecimiento celular. Se contaron 10 campos celulares con una magnificación de 10 X para cada tiempo y cada muestra.

DISCUSIÓN

Existen hasta el momento sólo dos trabajos de cierre dural in vitro, uno realizado en conejos y otro en cerdos, sin embargo no existen a la fecha otros modelos realizados con tejido humano como el que se presenta en este trabajo. La posibilidad de cultivar fibroblastos duros nos permite identificar patrones de crecimiento y síntesis de matriz extracelular que puedan contribuir a entender el proceso de cicatrización de la duramadre humana. Dado que las fistulas de LCR son un problema prevalente luego de una neurocirugía las respuestas que puedan emerger del uso del modelo podrían aplicarse tanto a su prevención como a su tratamiento.

Tanto la morfología celular fusiforme, la disposición en haces y la positividad para vimentina y desmina confirman que las células que completan el defecto dural son fibroblastos, lo mismo que sucedió en los modelos animales mencionados. Si bien este resultado

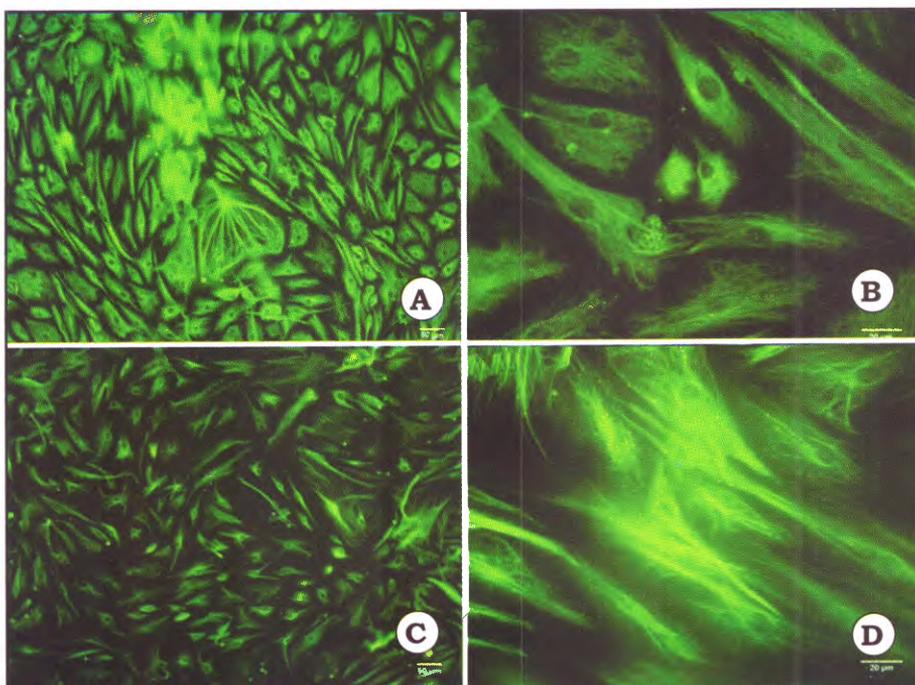


Fig. 4. Inmunofluorescencia indirecta para desmina (A 10X y B 40 X) y vimentina (C 10X y D 40X). Se ve intensa positividad nuclear citoplasmática que marca filamentos intermedios de desmina y vimentina.

concuera con lo esperado su documentación constituye un paso fundamental para progresar con futuras investigaciones.

Comparando el presente trabajo con los otros modelos existentes una diferencia sale a la luz: los fibroblastos humanos no necesitan una base de colágeno para migrar o proliferar. Tanto en el modelo porcino como en el modelo en conejos las células necesitaron una base de colágeno para crecer, en ambos casos no hubo crecimiento celular en su ausencia. De hecho y en parte fundamentándose en eso, los parches biológicos de duramadre actuales son membranas de colágeno de animales. Si bien se sabe que el colágeno provee un estímulo para el crecimiento y la reproducción de los fibroblastos su rol en células humanas durales parece ser mucho menor que el descripto en animales.

Otro dato relevante es que los fibroblastos comenzaron a poblar el borde dural a los 3-5 días, si bien este dato no es extrapolable a lo que sucede en los pacientes este dato es coincidente con los tiempos de cicatrización de otros tejidos, por ejemplo la piel. De esta manera cualquier medio para bajar la presión de LCR en el tratamiento de las fistulas (drenajes lumbares o ventriculares) debería permanecer por lo menos 5 días antes de ser retirado para permitir una buena cicatrización.

El modelo presentado se está utilizando en nuestro laboratorio con diferentes objetivos:

- Determinar el efecto de la dexametasona sobre la cicatrización dural
- Evaluar el efecto de la adición de polímeros de celulosa oxidada (Surgicell) al cultivo
- Evaluar el Spongostant como medio para el crecimiento tridimensional de fibroblastos
- Evaluar diferentes polímeros de colágeno para reconstituir duramadre humana a partir de sus células
- Evaluar los diferentes substitutos de duramadre existentes a la fecha con células de origen humano y no animal
- Evaluar el efecto y los mecanismos de transformación con las plásticas de tejidos autólogos usadas en la actualidad (grasa, músculo, pericráneo, fascia lata)

ABSTRACT

Objective. To develop a model of dura-mater healing in vitro. **Material and Method.** Human dura mater samples were obtained from surgeries to treat meningiomas in which resection of healthy dura was needed. Tissue that would not be needed for pathological analysis was used for cell culture. Informed consent was obtained in all cases. Cells were plated in Petri dishes with Dulbecco's essential media with 10% of fetal calf serum. The cell culture was characterized by common histological techniques and immunofluorescence. A proliferation curve was obtained.

CONCLUSIÓN

Se desarrolló el primer cultivo primario de duramadre humana descripto hasta el momento. Creemos que este modelo permitirá conocer las bases biológicas que participan en la cicatrización dural, los factores que influyen en la misma y el comportamiento de las diferentes plásticas durales.

Bibliografía

1. Garza-Hinojosa A, González-Cordero G, Flores-Gutiérrez JP, Garza-Guajardo R. Histología de la duramadre. Un nuevo concepto y sus implicaciones clínicas, 2004; 16.
2. Leonetti JP, Anderson D, Marzo S, Moynihan G. Prevention and Management of Cerebrospinal Fluid Fistula After Transtemporal Skull Base Surgery. **Skull Base** 2001; 11(2): 87-92.
3. Wei WI, Ng RW. Complications of resection of malignant tumours of the skull base: outcome and solution. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2007; 264(7): 733-9.
4. Litvack ZN, West GA, Delashaw JB, Burchiel KJ, Anderson VC. Dural augmentation: part I-evaluation of collagen matrix allografts for dural defect after craniotomy. **Neurosurgery** 2009; 65(5): 890-7.
5. Kumar A, Maartens NF, Kaye AH. Evaluation of the use of BioGlue in neurosurgical procedures. **J Clin Neurosci** 2003;10(6): 661-4.
6. Rosen CL, Steinberg GK, Demonte F, Delashaw JB Jr, Lewis SB, Shaffrey ME, Aziz K, Hantel J, Marciano FF. Results of the prospective, randomized, multicenter clinical trial evaluating a biosynthesized cellulose graft for repair of dural defects. **Neurosurgery**. 2011 Epub ahead of print
7. Jason A. Spector, Joshua A. Greenwald, Stephen M. Warren, Pierre J. Bouletreau, et al. Dura Mater Biology: Autocrine and Paracrine Effects of Fibroblast Growth Factor 2. **Plast Reconstr Surg** 2002; 109(2): 645-54.
8. Hakan Nurata, Berker Cemil, Gökhan Kurt, Nese Lortlar Uçankus, Fikret Dogulu, et al. The role of fibroblast growth factor-2 in healing the dura mater after inducing cerebrospinal fluid leakage in rats. **Journal of Clinical Neuroscience** 2009; 16: 542-4.
9. Schick B, Wolf G, Bernd FM, Romeike BF, Mestres P, Praetorius M, Plinkert PK. Dura Cell Culture. A new approach to study duraplasty **Cells Tissues Organs** 2003; 173: 129-37.
10. Zhou F, Chen G, Zhang JM, Huang ZS. An in vitro culturing model for rabbit dural cells. **Ann Clin Lab Sci** 2006 Summer; 36(3): 341-4.
11. Lipton, P., Pharmacogenetics: the ethical issues. **Pharmacogenomics Journal** 2003; 3(1): 14-6.
12. UNESCO Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura Declaración Internacional sobre los datos Genéticos Humanos. 16 oct 2003; .
13. Ley Nacional 25 326: Ley de Protección de los Datos Personales. Octubre 4 de 2000, Sancionada por el Senado y Cámara de Diputados de la Nación Argentina reunidos en Congreso.

Results. Cellular growth was evident in all samples between the third and fifth day, cells presented morphological characteristics of fibroblasts and stained positive for desmine and vimentine. Cells reached confluence by the fifth day in all cases.

Conclusion. We developed the first cell culture from human dura mater. We believe this study will help in the understanding of the mechanisms involved in dural closure, the potentials enhancers and inhibitors and to analyze the utility of the different dural closure techniques that are used up to date.

Key words: cell culture, dura-mater, dural healine.