

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA



Estudio de la neurogénesis en áreas discretas del sistema nervioso central inducida por desvascularización cortical

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Leslie Vargas Saturno como requisito parcial para optar por el título de Licenciada en Biología.

Tutor: Carlos Ayala Grosso, PhD

Asesora académica: Dra. Concepción Hernández

Caracas, Venezuela
Mayo, 2016


Este trabajo fue realizado en el **Laboratorio de Patología Celular y Molecular (LPCM)** del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), bajo la supervisión del Profesor Carlos Ayala Grosso.

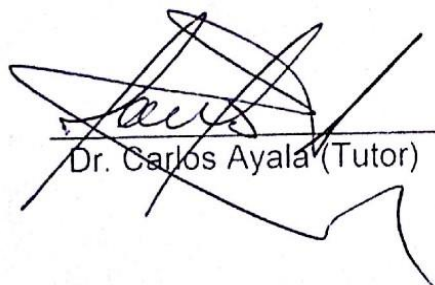
DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Quienes escribimos, los miembros del Jurado Evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Leslie Verónica Vargas Saturno, C.I. 18.249.390, titulado "ESTUDIO DE LA NEUROGÉNESIS EN ÁREAS DISCRETAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL INDUCIDA POR DESVASCULARIZACIÓN CORTICAL" para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los veintisiete días del mes de mayo del año 2016, dejando constar que la Prof. Concepción Hernández actuó como Coordinadora del Jurado Examinador.


Prof. Nathalie Gago


Prof. Fernando González


Dr. Carlos Ayala (Tutor)


Prof. Concepción Hernández

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, por todas sus enseñanzas y apoyo en la realización de este trabajo.

A los jurados: Profesora Nathalie Gago y Profesor Fernando González, por sus aportes en el presente trabajo.

A la Profesora Concepción Hernández, por su asesoría académica.

Al Centro de Estudios Avanzados (CEA) del IVIC, por recibirme como estudiante tesista.

Al personal del bioterio del IVIC, por brindarme su ayuda en la obtención de animales.

A Víctor Salazar, por su servicio prestado para la toma de imágenes de tinción de Nisll.

RESUMEN

El accidente cerebrovascular (ACV) es la primera causa de discapacidad en el mundo. La oclusión de un vaso sanguíneo es la forma más común de ACV, el cual genera la pérdida inmediata de oxígeno y glucosa en las células nerviosas, provocando la muerte celular. El daño generado conduce a severas discapacidades motoras y sensoriales en los pacientes afectados.

Históricamente se pensó que una vez alcanzada la madurez del sistema nervioso, la capacidad de renovación celular era limitada, por lo que en condiciones patológicas, la pérdida de neuronas era irreversible. Sin embargo, actualmente se sabe que existen dos regiones del cerebro adulto con una capacidad constitutiva de neurogénesis, estas regiones se denominan zona subgranular del giro dentado (ZSG) y la zona subventricular de los ventrículos laterales (ZSV). En estas dos zonas existen células madre neurales (CMN) con capacidad de autorenovación, proliferación y diferenciación generando neuronas y células gliales en forma permanente.

Esta capacidad neurogénica ofrece una alternativa terapéutica potencial ante un ACV, ya que permitiría la recuperación del tejido nervioso mediante mecanismos propios que promuevan el reemplazo de las neuronas afectadas. En este estudio se explora la proliferación celular en zonas neurogénicas del cerebro luego de la inducción de una isquemia cerebral a consecuencia de una desvascularización cortical (DC); modelo experimental que simula las condiciones fisiológicas de un ACV. Para lograr dicho objetivo se desarrolló: 1) un modelo murino de isquemia inducido por DC, 2) determinación del volumen de lesión cortical en un curso tiempo dependiente, 3) estimación de la proliferación celular en zonas neurogénicas a distintos tiempos post-lesión (día 1, 4, 7, y 10) y 4) caracterización fenotípica de las células que proliferan posterior a la desvascularización.

Como resultado de este trabajo se obtuvo que a consecuencia de la DC hubo un incremento de la proliferación celular en la ZSV y en el torrente migratorio rostral (TMR) al día 4 post-lesión. Dicho incremento es significativamente mayor en el hemisferio contralateral. Las células encontradas en estas zonas expresan marcadores específicos que siguen la secuencia de diferenciación neural. Aunado a esto hemos encontrado una importante proliferación celular en la corteza lesionada, que al ser caracterizada fenotípicamente demostró la presencia de neuroblastos en zonas adyacentes a la lesión.

Palabras claves: Células madre neurales, progenitores neurales, Neurogénesis, Desvascularización Cortical, Contralateral.

LISTA DE ABREVIATURAS

- **ACV**: accidente cerebro vascular.
- **BDNF**: factor neurotrófico derivado del cerebro, por sus siglas en inglés: *Brain-Derived Neurotrophic Factor*.
- **BrdU**: bromodesoxiuridina.
- **ChAT**: enzima biosintética colina acetiltransferasa, por sus siglas en inglés: *Choline Acetyltransferase Antibody*.
- **CMN**: células madre neurales.
- **DC**: desvascularización cortical
- **EGFr**: receptor del factor de crecimiento epidérmico, por sus siglas en inglés: *Epidermal Growth Factor*.
- **GFAP**: proteína ácida fibrilar glial, por sus siglas en inglés: *Glial Fibrillary Acidic Protein*.
- **GM1**: monosialogangliósido.
- **INF γ** : interferón gamma.
- **LCR**: líquido cefalorraquídeo.
- **NGF**: factor de crecimiento nervioso, por sus siglas en inglés *nerve growth factor*.
- **SDF-1**: factor derivado de células estromales, por sus siglas en inglés: *stromal cell-derived factor 1*.
- **SNC**: sistema nervioso central.
- **Sox2 ó SRY-box 2**: factor de transcripción cuya función es esencial en el mantenimiento de la auto-renovación de las células madre embrionarias no diferenciadas, por sus siglas en inglés: “*Sex determining Region Y-box 2*”.
- **TMR**: torrente migratorio rostral.
- **TNF α** : factor de necrosis tumoral, por sus siglas en inglés *tumor necrosis factor*.
- **ZSG**: zona subgranular.
- **ZSV**: zona subventricular de los ventrículos laterales.

INDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Neurogénesis durante el desarrollo embrionario	2
1.2 Neurogénesis en el cerebro adulto	4
1.3 Células madre neurales en el cerebro adulto	6
1.4 Accidente cerebrovascular	9
2. ANTECEDENTES	12
2.1 Modelo de desvascularización cortical	12
2.2 Neurogénesis en el cerebro adulto humano	13
2.3 Neurogénesis posterior a un daño	14
3. OBJETIVOS	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 Animales de experimentación	17
4.2 Inducción de lesión cortical por desvascularización cortical en la región parietal de ratones C57BL/6	17
4.3 Marcaje del componente proliferativo por administración intraperitoneal de BrdU a diferentes tiempos post-lesión	18
4.4 Fijación de tejido cerebral por perfusión intracardial con paraformaldehído al 4% en PB 0.1 M pH 7.4	19
4.5 Obtención de secciones flotantes seriadas de 25 µm mediante el uso de un microtomo de desplazamiento lateral	20
4.6 Determinación del volumen de lesión cortical mediante la tinción histoquímica con violeta de cresilo (tinción de Nissl)	20
4.7 Determinación de marcadores celulares y proliferación mediante métodos inmunofluorescentes	22
4.7.1 Componente proliferativo	22
4.7.2 Protocolo de inmunofluorescencia para detección de BrdU	23
4.7.3 Caracterización fenotípica de Células en proliferación	25
4.8 Observación y cuantificación mediante microscopía de fluorescencia	26
5. RESULTADOS	27

5.1 Establecimiento de un modelo murino de desvascularización cortical	27
5.2 Determinación del volumen de lesión inducida por DC mediante tinción de Nissl	28
5.3 Estimación de la proliferación celular inducida por DC	30
5.3.1 Zona subgranular	30
5.3.2 Zona subventricular	33
5.3.4 Torrente migratorio rostral	35
5.3.5 Corteza lesionada	35
5.4 Caracterización fenotípica de las células que proliferan posterior a la DC	38
6. DISCUSIÓN	49
6.1 Neurogénesis post-lesión en zonas neurogénicas clásicas	50
6.2 Proliferación en el TMR	52
6.3 Neurogénesis contralateral	53
6.4 Corteza ipsilateral	55
6.4.1 Disminución del volumen lesión	55
6.4.2 Proliferación celular	57
6.4.3 Nuevos neuroblastos en corteza lesionada	58
7. CONCLUSIONES	60
8. BIBLIOGRAFÍA	61

1. INTRODUCCIÓN

La organización del sistema nervioso involucra complejos circuitos neuronales que son producto de la interacción entre los distintos tipos celulares presentes. La expresión del comportamiento no es más que la respuesta funcional de la interacción de diversos grupos celulares. En condiciones patológicas, la pérdida de los somas o de los terminales nerviosos trae como consecuencia la aparición de desórdenes neurológicos característicos, por ejemplo, la pérdida de los somas dopaminérgicos en la sustancia Nigra, trae como consecuencia la desregulación de los núcleos de cuerpo estriado y esto se traduce en la expresión de temblor en reposo en la enfermedad de Parkinson (Kandel, 2001). El objetivo primario de toda aproximación terapéutica es estimular, inhibir o sustituir la función de algún componente involucrado en la neuroquímica del sistema nervioso con el objetivo de restablecer la conectividad neuronal y su control.

El restablecimiento de las conexiones neurales entre los diferentes núcleos del cerebro, luego de su pérdida a consecuencia de diversas patologías representa un desafío desde el punto de vista terapéutico, debido a los múltiples tipos celulares presentes en el sistema nervioso central (SNC) adulto y la precisión con la que éstos deben interactuar en el tiempo y espacio. Por lo que, estrategias experimentales que tienen como objetivo la reparación neural han recibido mucha atención en los últimos años (Goldman, 2005)

Estudios pioneros acerca del sistema nervioso propusieron que una vez alcanzada la madurez del sistema nervioso adulto, la muerte o pérdida de neuronas era irreversible ya que éstas no podían ser reemplazadas (Ramón y Cajal, 1952). Es probable que la pobre capacidad de generar células de reemplazo sea una causa importante de enfermedades neurológicas. En la mayoría de las regiones del cerebro, la generación de neuronas y la conectividad está limitada generalmente a un período de desarrollo discreto, por lo que la sustitución de las neuronas implica no sólo la incorporación de un nuevo componente celular sino el desarrollo de la conectividad adecuada dentro de un circuito de relevancia funcional. Desde hace varios años se han descrito dos regiones del cerebro con una capacidad constitutiva de neurogénesis, éstas regiones se denominan zona subgranular del giro dentado (ZSG) (Alvarez-Buylla y col., 2001) y la zona subventricular de los ventrículos laterales (ZSV) (Altman y Das, 1965).

Un entendimiento básico del desarrollo neural es un requisito previo para el desarrollo y entendimiento de estrategias racionales con la neurogénesis en el cerebro adulto.

1.1 Neurogénesis durante el desarrollo embrionario

Los procesos de neurogénesis celular que se llevan a cabo durante la formación del tejido nervioso, generan un sistema altamente organizado capaz de proporcionar al nuevo ser una eficiente red de comunicación con gran respuesta adaptativa, y con la peculiaridad de responder autónomamente a estímulos físicos y químicos originados tanto en el medio interno como en el externo. De esta manera,

el SNC permite integrar y controlar las diferentes funciones del organismo (Alberts, Coll, y Sande, 2004).

El sistema nervioso comienza su desarrollo en la tercera semana de gestación en el humano. En este proceso el notocordio en desarrollo y el mesodermo subyacente estimulan al ectodermo a proliferar haciendo que éste incremente en el número de células, formándose así la placa neural. La inducción neural, trae como consecuencia que células ectodérmicas se diferencien a células madre neurales y se genera una producción inicial de células nerviosas. Una vez completado el proceso inductivo, la placa neural se alarga desde su sitio de origen craneal y se eleva para formar los pliegues neurales; la porción media entre los pliegues neurales forma el surco neural (Fig. 1). Los pliegues neurales se elevan aún más, se acercan y se fusionan irregularmente en la línea media formando el tubo neural (Fig. 1) (Jessell y Sanes, 2001; Purves y col., 2008).

Un grupo de células neuroectodérmicas, pertenecientes a la cresta neural migran activamente a partir de la zona dorsal del tubo neural siguen vías específicas de migración y forman distintos componentes del sistema nervioso periférico, como por ejemplo, ganglios de la raíz posterior, ganglios autónomos, ganglios de los pares craneales, células de Schwann, las leptomeninges (aracnoides y piamadre), melanocitos y médula suprarrenal. En consecuencia, el tubo neural es el que se convertirá por diferenciación en encéfalo y médula espinal, mientras que las crestas neurales formarán la mayor parte del sistema nervioso periférico (Kandel, Schwartz, y Jessell, 2001).

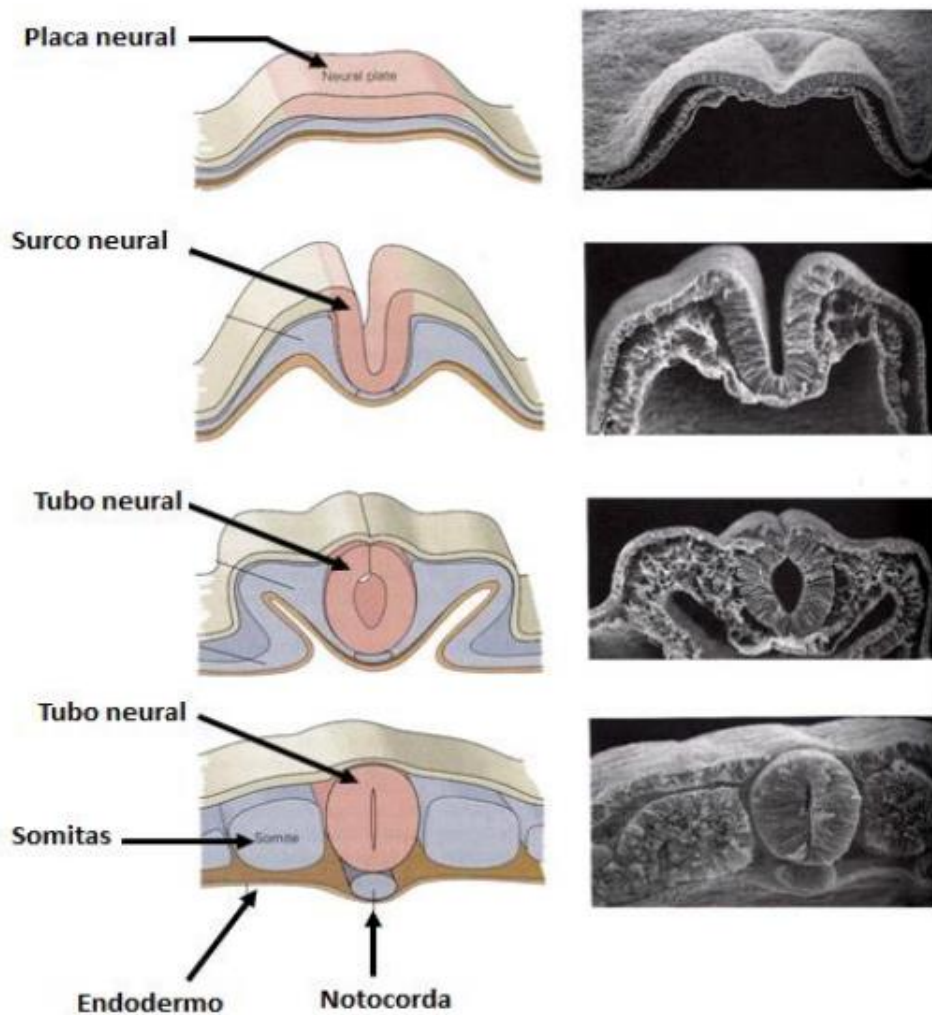


Figura 1. Desarrollo del tubo neural. Esquema del desarrollo embrionario del tubo neural durante la fase de gastrulación (izquierda). Micrografías de microscopía electrónica del tubo neural en desarrollo (derecha) (Tomada y modificada de Jessel y Sanes, 2001).

1.2 Neurogénesis en el cerebro adulto

El recambio celular de la mayoría de los tejidos adultos ocurre por la capacidad de autorenovación y diferenciación de las células madre multipotentes que pueden generar un precursor tisular. Hasta hace poco, se pensaba que el sistema nervioso central era una excepción a esta regla general. Durante décadas, los neurobiólogos

habían establecido la idea de que las neuronas en el cerebro adulto tenían pocas posibilidades de recambiarse y que las células madre precursoras del tejido nervioso se agotaban en el cerebro perinatal, por lo que la generación de nuevas neuronas cesaba con la madurez. Desde mediados de los años 60, se ha demostrado que el cerebro adulto es capaz de remodelarse con el aporte de las células progenitoras neurales y gliales a largo de la vida de un animal (Altman y Das, 1965).

La demostración de este proceso ha desafiado antiguos prejuicios sobre el desarrollo del cerebro, y ha proporcionado una oportunidad para explorar experimentalmente la identidad de las células madre neurales y los mecanismos mediante los cuales se generan células diferenciadas. En particular, la existencia de este proceso ofrece una oportunidad única para identificar los tipos de células que funcionan como las células madre en el adulto y comparar funcionalmente con las células madre embrionarias. La comprensión y la potencial modulación de los mecanismos de desarrollo de las células madre neurales en el embrión y el adulto tienen profundas implicaciones terapéuticas y permiten comprender cómo se construye y se mantiene la citoarquitectura del cerebro durante toda la vida de un animal (Alvarez-Buylla y col., 2001).

La función más importante de las CMN es la generación de nuevas neuronas. Estas células madre en la SVZ generan neuroblastos que migran a través de la corriente migratoria rostral (TMR) hacia el bulbo olfatorio, donde generan interneuronas esenciales para el mantenimiento de las funciones olfatorias (Kokovay, Shen, y Temple, 2008; Li y col., 2009). De igual manera, las neuronas producidas en la ZSG del hipocampo se integran en la capa de células granulares

inmediatamente adyacente a él, donde son importantes para el aprendizaje y la memoria (Li y col., 2009).

1.3 Células madre neurales en el cerebro adulto

Las CMN que residen dentro de la ZSV y SGZ presentan características similares. En la ZSV, existen tres poblaciones de precursores que se encuentran adosadas a una capa de células endodimales que recubren la pared de los ventrículos cerebrales y están en contacto con el líquido cefalorraquídeo (Fig. 2) (revisado por Miller y Gauthier-Fisher, 2009; revisado por Lin y Iacovitti, 2015). Las CMN llamadas células tipo B son células relativamente quiescentes que expresan marcadores como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) de astrocitos. Estas células B dan lugar a células amplificadoras, llamadas células tipo C, una población que es GFAP negativa, pero positivas para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr) y el factor de transcripción Dlx2.

La tercera población corresponde a los neuroblastos, llamadas células tipo A que expresan marcadores de neuronas nuevas como Doble cortina (DCX) y forma polisialilada la molécula de adhesión de células neurales (PSA-NCAM).

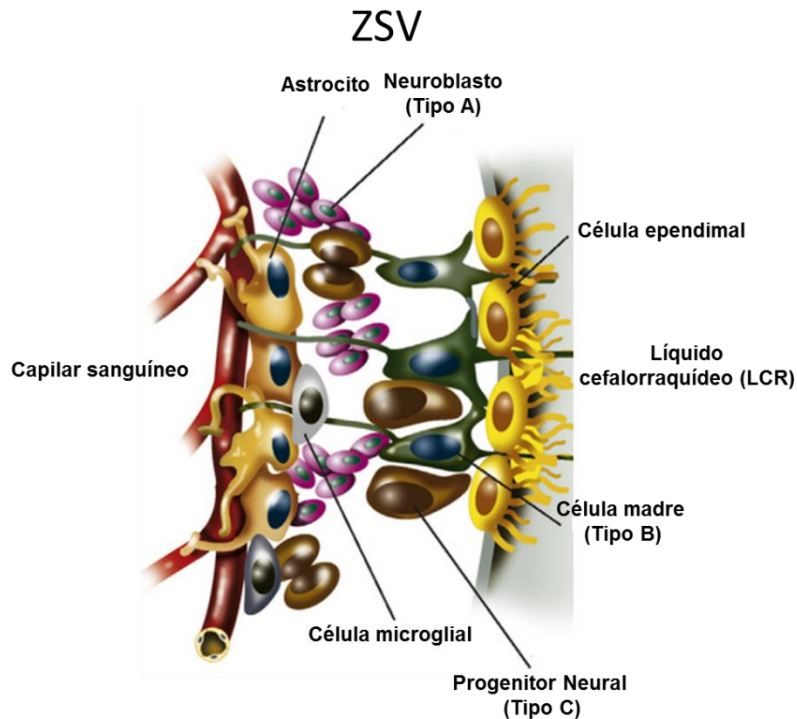


Figura 2. Nicho neurogénico de la zona subventricular (ZSV). (Tomado y modificado de Lin y Iacovitti, 2015).

En contraste, el nicho de la ZSG tiene una estructura más laminar y es el nicho de dos tipos de células madre neurales las cuales expresan el marcador Sox2 (Fig. 3). Una de estas poblaciones se divide con poca frecuencia, expresa GFAP y Sox2, y tiene un proceso radial que se extiende por la capa de células granulares adyacente, llamadas CMN radiales ó progenitores tipo 1. La segunda población se divide con mucha más frecuencia, expresan Sox2, pero no GFAP, llamadas CMN no radiales ó progenitores tipo 2. Estos precursores Sox2-positivos dan lugar a

neuroblastos que migran dentro de la capa de células granulares adyacente y se integran en el circuito del hipocampo (Revisado por Miller y Gauthier-Fisher, 2009; revisado por Lin y Iacovitti, 2015).

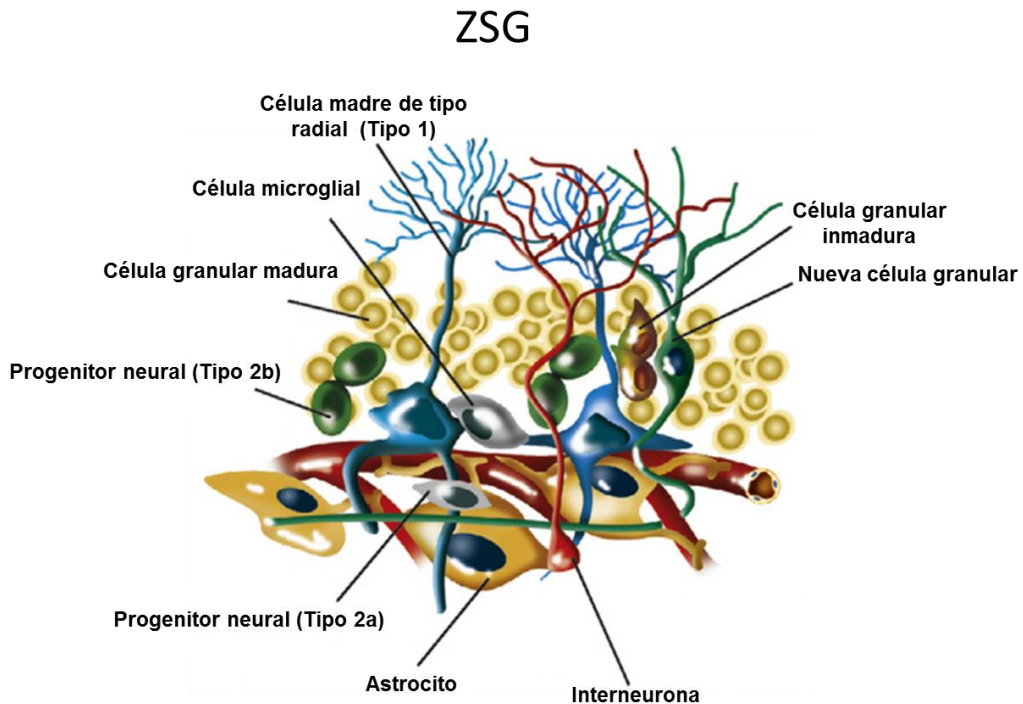


Figura 3. Nicho neurogénico de la zona subgranular (ZSG). (Tomado y modificado de Lin y Iacovitti, 2015).

Sabiendo la existencia de las CMN en el cerebro adulto con la capacidad de reemplazar células y sus circuitos correspondientes, tanto en el hipocampo como en el bulbo olfatorio, permite preguntarse si en condiciones patológicas las zonas neurogénicas podrían responder como mecanismo de reparación. La condición patológica más común asociada al SNC es el accidente cerebro vascular.

1.4 Accidente cerebrovascular

La disminución repentina del flujo sanguíneo por la generación de un trombo en un vaso sanguíneo del cerebro se conoce como accidente cerebrovascular (ACV). Los ACV son la segunda causa de mortalidad y la primera causa de discapacidad a nivel mundial. El ACV es responsable de por lo menos el 9 % de todas las muertes a nivel mundial (Donnan, Fisher, Macleod, y Davis, 2008).

La oclusión de un vaso sanguíneo es la causa más común de accidente cerebrovascular, el cual genera como resultado la pérdida casi inmediata del suministro de oxígeno (O_2) y glucosa a las células nerviosas (Lakhan y col., 2009). La región del cerebro que sufre la pérdida de la irrigación por consecuencia de la falta de oxigenación se denomina zona isquémica, dentro de esta zona, la región en la que el flujo sanguíneo disminuye por debajo del umbral de fallo energético, es el núcleo del infarto y la penumbra es la región periférica al núcleo en donde el suministro de sangre es limitado, pero se conserva el estado energético (Ceulemans y col., 2010; Hossmann, 2006; Hossmann, 2012). En la zona isquémica, la reducción de los niveles de O_2 y de glucosa conducen a un cese en la producción de ATP y en consecuencia de todos los procesos dependientes de esta molécula (Durukan y col., 2007). A corto plazo, los transportadores de iones dependientes de ATP, como por ejemplo la bomba Na^+/K^+ ATPasa, disminuyen su función, lo que se traduce en una despolarización prolongada conocida como despolarización anóxica terminal (Hossmann, 2012).

Este evento va seguido de un incremento del flujo de calcio (Ca^{2+}) al interior celular lo que promueve la liberación de neurotransmisores. El neurotransmisor con mayor impacto en este proceso es el glutamato, ya que su liberación exacerbada y de larga duración deteriora la función neuronal por excitotoxicidad. El ingreso masivo de Ca^{2+} en la excitotoxicidad está seguido por la activación de las enzimas dependientes de Ca^{2+} (Ceulemans y col., 2010; Lakhan y col., 2009), como calpains (Durukan y col., 2007). En una observación global las consecuencias que se generan de estos procesos son: la generación de estrés oxidativo, daño en la microvasculatura, muerte celular por necrosis y apoptosis, e iniciación de la inflamación post-isquémica (Hossmann, 2012; Lakhan y col., 2009).

El daño a los circuitos neuronales generado a consecuencia de la isquemia durante el desarrollo de la isquemia conduce a severas discapacidades motoras y sensoriales en los pacientes afectados (Lakhan y col., 2009). En muchos pacientes puede haber una recuperación funcional espontánea dentro de los 3 primeros meses luego de haber ocurrido el ACV. Esta recuperación motora pudiera estar asociada a un aumento de la actividad en las conexiones neurales existentes por una respuesta de plasticidad inducida por el daño. Adicionalmente es probable que ocurra un incremento de la neurogénesis en las ZSV y ZSG del cerebro, e inducción de la migración de neuroblastos hacia la zona isquémica (Lakhan y col., 2009). Es de notar que la respuesta neurogénica o la cantidad de neuroblastos generados probablemente sean insuficientes para restaurar la función neural en su totalidad (Lee y col., 2010).

Es por ello que la presencia de CMN en el cerebro adulto, plantea la posibilidad de promover o estimular el proceso de neurogénesis en el individuo para reemplazar las neuronas lesionadas después de un evento isquémico como terapia regenerativa. El interés de este trabajo es explorar la función neurogénica del cerebro posterior a una isquemia cerebral, para realizar esto, es necesario el uso de un modelo experimental que simule algunos eventos típicos del ACV en humanos.

El desarrollo de modelos experimentales de isquemia implica la interrupción temporal o permanente de la irrigación de una región particular del cerebro. El diseño quirúrgico y la magnitud de la lesión generada busca simular una variedad de condiciones clínicas asociadas con la isquemia cerebral (Mhairi, 1992). Entre los modelos experimentales más utilizados se encuentran los modelos de isquemia global que son generados por oclusión de las arterias vertebrales (2 vasos), arterias carótidas (2 vasos), o ambos (4 vasos) durante 5-15 minutos para simular la condición de oclusión coronaria en humanos (Eklof, 1972; Pulsinelli, 1979).

En este trabajo se utilizará un modelo de desvascularización cortical (DC) desarrollado por Sofroniew y colaboradores en el año 1983. Este modelo experimental genera un impacto sobre la función cortical mucho menor que los modelos descritos anteriormente, sin embargo se reconoce su potencial en la simulación de eventos isquémicos (Sofroniew y col., 1983).

2. ANTECEDENTES

2.1 Modelo de desvascularización cortical

A principio de los años ochenta, Sofroniew y colaboradores estudiaron un modelo de disfunción colinérgica en ratas mediante la inducción de daño cortical unilateral en la corteza cerebral izquierda, la cual fue generada mediante la eliminación de la pía-aracnoides. Este daño induce la pérdida de los terminales colinérgicos corticales y la degeneración retrograda de las proyecciones colinérgicas de largo alcance que se originan en el núcleo basal de Meynert e inervan la región cortical del cerebro (Sofroniew, Pearson, Eckenstein, Cuello, y Powell, 1983). El núcleo basal de Meynert es un grupo de neuronas en la sustancia innominada del cerebro anterior basal que tiene proyecciones de largo alcance hacia la neocorteza. Las neuronas que conforman el núcleo basal son ricas en acetilcolina y colina acetiltransferasa (ChAT).

Mediante métodos inmunohistoquímicos, y haciendo uso de un anticuerpo monoclonal anti-ChAT, los investigadores identificaron las neuronas colinérgicas y reportaron una disminución del 70% en la actividad de ChAT luego de haber generado un daño cortical en la corteza cerebral (Sofroniew y col., 1983).

Posterior a este estudio, luego de saber que en un modelo de daño cortical unilateral produce una marcada disminución en la actividad de ChAT, en el año 1989 Elliott, Garofalo y Cuello, desarrollaron el mismo modelo de daño cortical en ratas maduras. Reportaron que la administración intracerebro-ventricular (ICV) del monosialogangliósido GM1 evita la disminución de la actividad de ChAT ya que GM1 ejercía una acción “protectora” de las neuronas colinérgicas del cerebro

anterior. Adicionalmente los investigadores evaluaron los efectos conductuales a consecuencia de la lesión cortical. Sugirieron que por efecto de la degeneración retrograda de las proyecciones colinérgicas se producen alteraciones somato-sensoriales, motoras y cambios en comportamientos asociados al aprendizaje y la memoria (Elliott y col., 1989).

En particular, los investigadores demostraron que la desvascularización cortical unilateral en la neocorteza genera un aumento de la actividad locomotora espontánea en pruebas de campo abierto con respecto a los animales controles, no lesionados. Además reportaron que el animal lesionado presenta un déficit en la coordinación motora y una disminución de la respuesta de retención de información previamente aprendida en el laberinto acuático de Morris. La administración de GM1 (ICV), a pesar de que evita la disminución de expresión de la enzima ChAT, no ejerce ningún efecto sobre el déficit de la coordinación motora y no mejora la retención de la información en tareas asociadas a la memoria (Elliott y col., 1989).

2.2 Neurogénesis en el cerebro adulto humano

La neurogénesis en el cerebro humano se demostró por primera vez en 1998, con los hallazgos de Eriksson y colaboradores. La evidencia se obtuvo al examinar tejido cerebral de autopsias de pacientes que habían sido tratados previamente con Bromodesoxiuridina (BrdU), un nucleótido análogo a la timidina, el cual se incorpora en el ADN de las células en proliferación, como un indicador de proliferación en células tumorales. Mediante el uso de un anticuerpo anti-BrdU junto con marcadores específicos para neuronas, como NeuN, calbindina o enolasa, demostraron que las células doblemente marcadas correspondían a neuronas nuevas que se generan a

partir de la división de células progenitoras en el giro dentado y zona subventricular de humanos adultos y que además, este proceso neurogénico es una propiedad conservada a lo largo de toda la vida del individuo (Eriksson y col., 1998).

2.3 Neurogénesis posterior a un daño

Debido a que la neurogénesis persiste en el cerebro adulto de mamíferos y puede ser regulada por procesos fisiológicos y patológicos, en el año 2001 Jin y colaboradores estudiaron el proceso de neurogénesis en respuesta a una isquemia cerebral focal generada por oclusión de la arteria cerebral media en ratas adultas.

Mediante la administración de 5- bromo-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (BrdU) durante dos días, evaluaron la neurogénesis a 1, 2 y 3 semanas post-lesión. Los investigadores reportaron que la isquemia generada produjo un incremento de la incorporación de BrdU en las zonas neurogénicas del cerebro; la zona subgranular del giro dentado y la zona subventricular de los ventrículos laterales. Este incremento de la proliferación ocurrió de manera bilateral, siendo el hemisferio ipsilateral mayor que el hemisferio contralateral. Sumado a esta observación, los investigadores reportan que las células BrdU+ coexpresan con marcadores de neuronas inmaduras (doblecortina), pero no expresaron los marcadores de neuronas maduras (NeuN). Estos resultados sugieren que la neurogénesis inducida por una isquemia es producto de un proceso adaptativo que contribuye a la recuperación después de un accidente cerebrovascular (Jin y col., 2001).

La arquitectura celular y vascular presente en el nicho neurogénico de la zona subventricular juega un papel importante en la regulación de la función de las CMN en el cerebro adulto. Sin embargo, esta regulación *in vivo* en respuesta a un accidente cerebrovascular sigue siendo en gran medida desconocida.

Zhang y colaboradores en el año 2014 estudiaron la arquitectura de las células madre neurales y los vasos sanguíneos en la zona subventricular de ratones adultos sometidos a una isquemia cerebral, mediante la oclusión de la arteria cerebral media. Posterior a la isquemia, los ratones fueron tratados con BrdU con el fin de evaluar la proliferación celular post-isquemia.

Los investigadores reportaron que existe un incremento en las células madre neurales y angiogénesis en la SVZ posterior a la isquemia generada (Zhang y col, 2014)

Tomando en cuenta que la función neurogénica representa una respuesta adaptativa del tejido nervioso, en el presente trabajo se estudiará la neurogénesis en zonas clásicas del cerebro en respuesta a una isquemia cortical focalizada, mediante la desvascularización superficial de la corteza parietal de ratones C57BL/6. Bajo un esquema de administración de BrdU post-lesión, se caracterizará los tipos celulares en proliferación.

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Estudiar la proliferación celular en zonas neurogénicas del cerebro luego de una isquemia focal a consecuencia de una desvascularización cortical.

Objetivos específicos:

- Desarrollar un modelo murino de isquemia inducido por desvascularización cortical.
- Determinar el área de lesión cortical mediante violeta de cresilo (tinción de Nissl).
- Estimar la proliferación celular post-lesión en zonas neurogénicas y en la corteza cerebral, mediante la administración de Bromodesoxiuridina (BrdU).
- Caracterizar fenotípicamente las células que proliferan posterior a la desvascularización.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones machos de la cepa C57/BL6 de 4 semanas de edad, con peso entre 20 a 25 gramos, provenientes del bioterio central del IVIC. Los ratones fueron alimentados ad libitum y mantenidos en condiciones apropiadas de temperatura y luz, siguiendo los criterios recomendados a nivel institucional por el Comité de Bioética Animal (COBIANIM) cuidado de los animales de experimentación.

4.2 Inducción de lesión cortical por desvascularización cortical en la región parietal de ratones C57BL/6

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina 75/7,5 mg/Kg por peso del animal, preparada en solución salina y administrada por vía intraperitoneal (ip). Una vez demostrada la anestesia, se colocaron en un aparato estereotáxico de ratón. Se realizó una incisión interocular de 2 cm en la piel que recubre el cráneo. La fascia y el músculo se retrajeron temporalmente descubriendo el lado izquierdo del hueso parietal del cráneo.

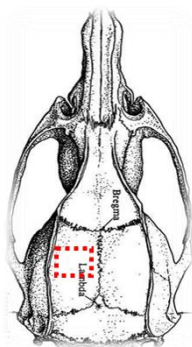


Figura. 4 Esquema de apertura de la ventana.

Con un taladro de microcirugía se realizó una incisión en el cráneo de 3 x 3 mm a 1 mm posterior desde bregma y 1 mm lateral desde la sutura intraparietal (Fig. 4), hasta exponer la duramadre. Con una pinza se rasgó la meninge y se expuso la superficie del cerebro.

La vasculatura de la pía aracnoides se removió utilizando un hisopo con punta de algodón y papel absorbente. Los animales control, corresponden a un animal operado, no lesionado (SHAM), los cuales fueron sometidos al mismo procedimiento quirúrgico, pero sin el procedimiento de eliminación de la meninge y la vasculatura. Al culminar la cirugía los animales fueron suturados, se les colocó una solución antiséptica de iodo, gel oftálmico y se les administró analgésico dipirona (0,5mg/ml) por vía subcutánea. Posteriormente se colocaron bajo una lámpara de baja intensidad y se monitorearon hasta que el animal se recuperó de la anestesia (Sofroniew y col., 1983).

4.3 Marcaje del componente proliferativo por administración intraperitoneal de BrdU a diferentes tiempos post-lesión

Una vez que los animales (lesionados y controles) se recuperaron de la anestesia, transcurridas 2h fueron tratados con bromodesoxiuridina (BrdU) por vía intraperitoneal. La BrdU se administró en 3 dosis de 50mg/kg, cada dos horas, siguiendo el esquema de la figura 5. Para determinar la proliferación, los animales fueron sacrificados a los días 1, 4, 7 y 10 post-cirugía, siguiendo el protocolo de fijación por perfusión (Fig. 6).

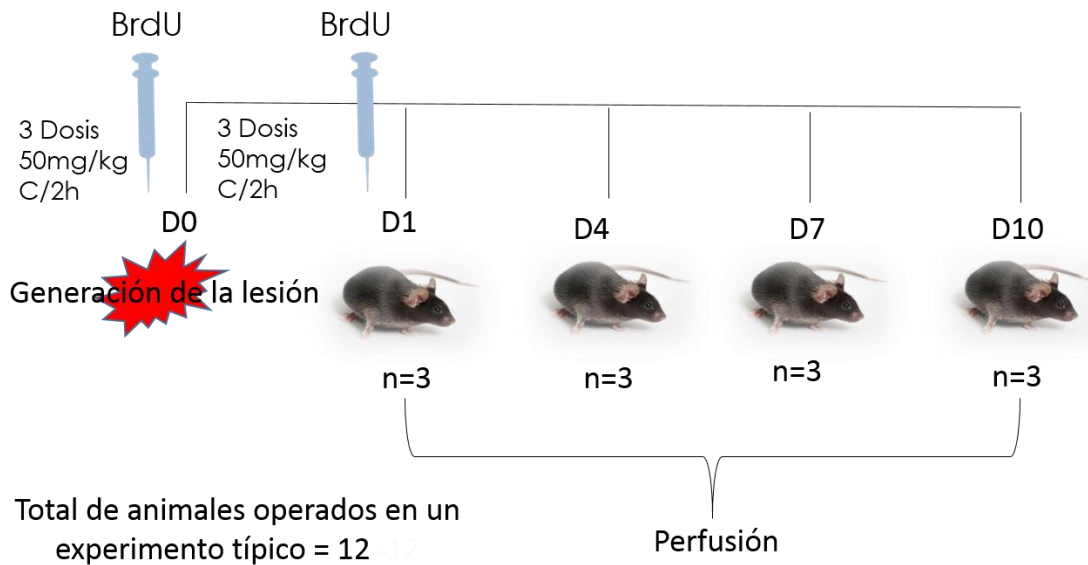


Figura 5. Esquema de administración de BrdU post-cirugía. Protocolo desarrollado en el laboratorio de patología celular y molecular, IVIC.

4.4 Fijación de tejido cerebral por perfusión intracardial con paraformaldehído al 4% en PB 0.1 M pH 7.4

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina-xilacina para una dosis de (75-7,5 mg/Kg). Posteriormente se realizó una incisión medial de la piel para exponer la caja torácica hasta exponer el corazón, se introdujo una cánula por el ventrículo izquierdo hasta llegar a la arteria aorta ascendente, inmediatamente se cortó la aurícula derecha. Con ayuda de un bomba peristáltica se comenzó a perfundir PBS, a una velocidad no mayor a 8ml/min, a través de la cánula para desangrar por completo animal, inmediatamente se hizo pasar paraformaldehído al 4% en PB 0.1 M pH 7,4 (Fig. 6). Una vez perfundido el animal se realizó la extracción del cerebro, el cual fue colocado en paraformaldehído, durante 48 horas a 4°C. Posteriormente se transfirió a una solución de sacarosa al 30% en buffer fosfato 0.1 M y almacenado a 4°C.

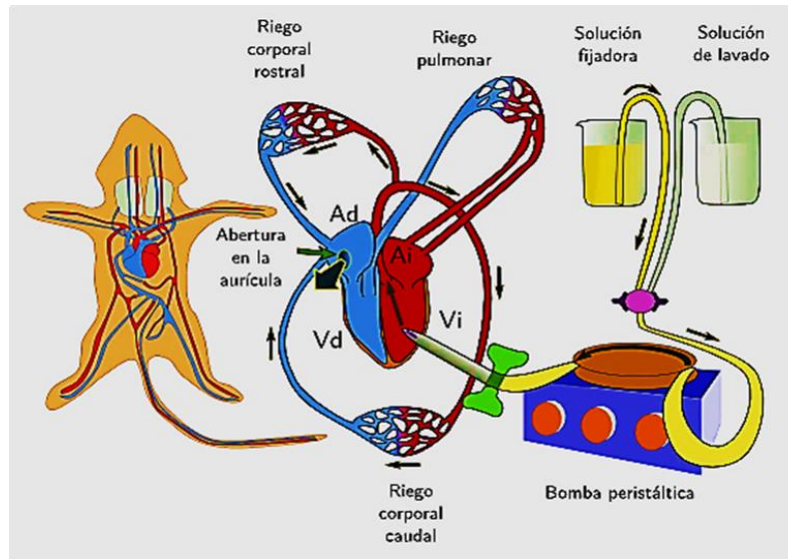


Figura 6. Esquema de perfusión intracardial, (tomado y modificado: <http://mmeqias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/2-metodos-fijación.php>)

4.5 Obtención de secciones flotantes seriadas de 25 µm mediante el uso de un microtomo de desplazamiento lateral

El tejido se seccionó haciendo uso de un microtomo de desplazamiento lateral Leica SM2010R (Leica Biosystem, Alemania). Se generaron cortes sagitales seriados de 25 µm de espesor, tanto del hemisferio lesionado, como del hemisferio no lesionado. Las secciones fueron colocadas en placas de 96 pozos en solución de criopreservación (25 % buffer fosfato 0,2M + 25% glicerol + 30 % etilenglicol + 20% H₂O_d) y refrigeradas a -20°C, para su posterior examen inmunohistológico.

4.6 Determinación del volumen de lesión cortical mediante la tinción histoquímica con violeta de cresilo (tinción de Nissl)

El violeta de cresilo es un colorante, que tiñe el núcleo celular y el retículo endoplasmático rugoso (sustancia de Nissl) y se emplea para las tinciones generales del sistema nervioso. Mediante el uso de esta tinción histoquímica se puede evidenciar la citoarquitectura que describe la organización de los somas

neuronales en regiones del cerebro, lo que nos permite observar con facilidad la zona lesionada.

Se seleccionaron 4 secciones sagitales, separadas cada 100 μm a 1mm de la línea media, para el hemisferio lesionado y el no lesionado (Fig. 7). Este muestreo se realizó para cada día post-lesión. Las secciones fueron teñidas con una solución 0,1% de violeta de cresilo y montadas para su observación al microscopio de luz (Coté y Cuello, 1993). De cada corte ya teñido se obtuvieron imágenes digitales que permitieron con ayuda de un programa de procesamiento de imágenes la estimación del área de lesión, y posteriormente, considerando la separación entre cada corte, se estimó el volumen de la lesión a los diferentes días post-lesión. Esta variable permite observar la progresión de la lesión en el tiempo post-cirugía.

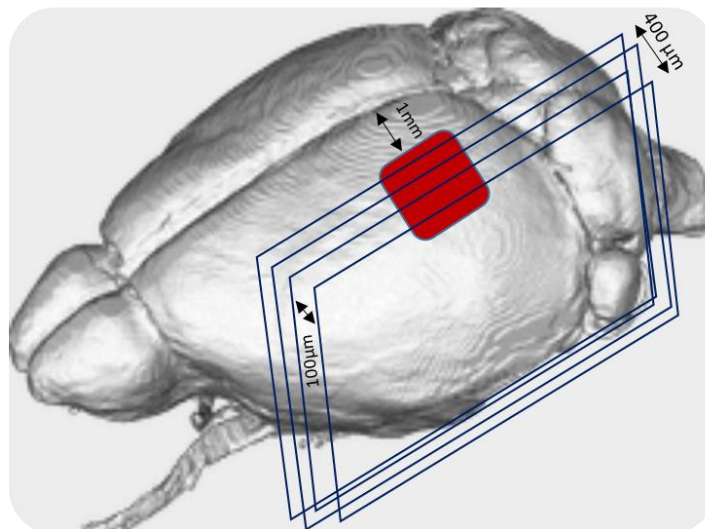


Figura 7. Esquema de muestreo de secciones sagitales de cerebro para la tinción de Nissl. Cuatro (4) secciones sagitales, separadas cada 100 μm , para el hemisferio lesionado y no lesionado. Esquema desarrollado en el laboratorio de patología celular y molecular, IVIC.

4.7 Determinación de marcadores celulares y proliferación mediante métodos inmunofluorescentes

4.7.1 Componente proliferativo

Para establecer la proliferación se determinó la incorporación del compuesto BrdU, mediante técnicas inmunofluorescentes, haciendo uso de un anticuerpo primario monoclonal anti-BrdU (AbD serotec, USA) generado en rata a una concentración de 1:400, y un anticuerpo secundario anti-rat Alexa fluor 546, a una concentración de 1:200. Se seleccionaron seis (6) cortes sagitales (separados cada 100µm) en ambos hemisferios del cerebro y en al menos tres (3) animales distintos para cada tiempo experimental. La variable cuantificada fue el número de células BrdU⁺ en cada una de las zonas estudiadas. Se cuantificó la proliferación celular post-lesión por zonas específicas del cerebro: la ZSV y ZSG, ambas zonas neurogénicas clásicas, el torrente migratorio rostral (TMR) y la corteza cerebral lesionada (CTZ).

Los resultados fueron reportados cualitativamente mediante imágenes por zonas del cerebro y de manera cuantitativa mediante gráficos donde se describe la neurogénesis en el tiempo.

4.7.2 Protocolo de inmunofluorescencia para detección de BrdU

Las secciones fueron lavadas con Buffer Fosfato Salino (PBS) para eliminar los restos del medio de criopreservación y posteriormente incubadas con 3% peróxido de hidrógeno en 100% metanol para neutralizar la peroxidasa endógena y retirar los restos de sangre que pueden generar señal fluorescente inespecífica.

Posteriormente, el tejido se incubó en HCl 2N a 37°C con el fin de desnaturalizar el ADN y exponer la BrdU incorporada. Seguido a este paso, fue necesario neutralizar el ácido con Buffer borato a temperatura ambiente.

Antes de incubar el anticuerpo primario, el tejido fue permeabilizado y bloqueado. En el caso de la permeabilización, esta se realizó haciendo uso del detergente Tritón X-100 0,1%, para facilitar el acceso de los anticuerpos al interior del tejido. Por otro lado, el bloqueo consiste en incubar el tejido con una solución de proteínas, generalmente albúmina sérica bovina (BSA) con el fin de saturar epítopes inespecíficos y aumentar la probabilidad de que el anticuerpo se una sólo a su verdadero antígeno. Una vez permeabilizado y bloqueado el tejido se procede a incubar el anticuerpo primario Rat Anti-BrdU (AbD serotec, USA) 1:400 por 48 horas a 4°C (Fig.8).

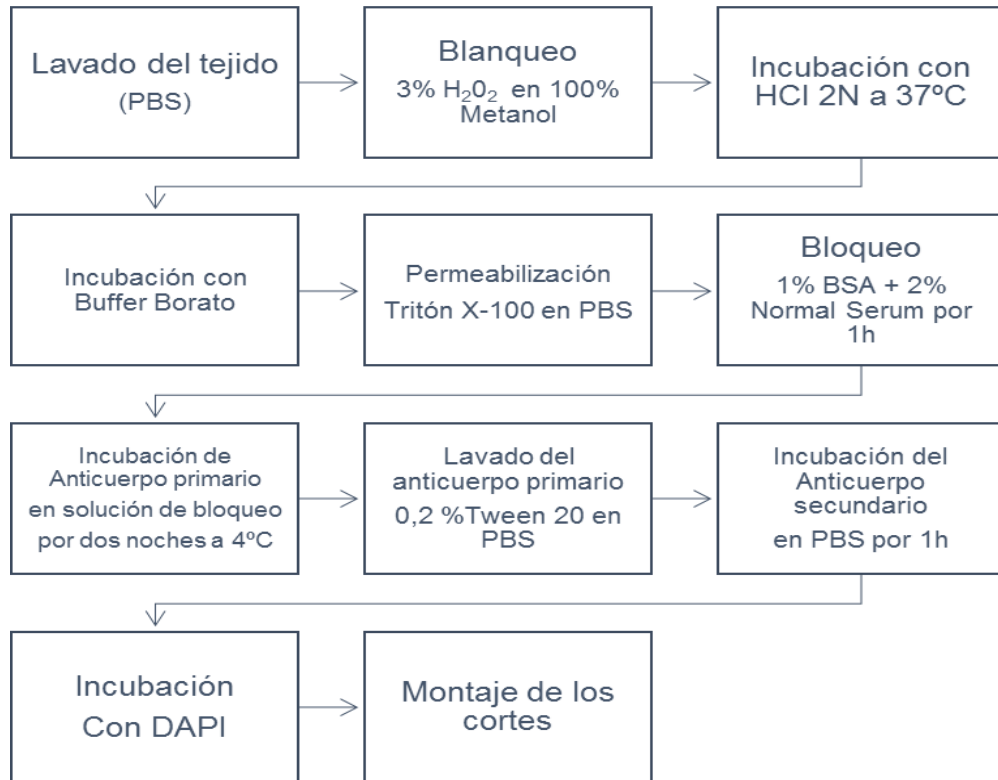


Figura 8. Esquema resumen de protocolo de inmunofluorescencia para detección de BrdU. Protocolo desarrollado en el laboratorio de patología celular y molecular.

Una vez pasada las dos noches de incubación, el anticuerpo primario se lavó con un detergente, en este caso, tween 20 0,2% y se procede a incubar el anticuerpo secundario Anti-Rat Alexa fluor 546 1:200 por 2 horas. Por último, las secciones son incubadas con DAPI, con el fin de marcar núcleos de las células en el tejido. En cada experimento de inmunofluorescencia se incluyen animales controles (no lesionados), lesionados y controles negativos, los cuales corresponden a secciones en ausencia de anticuerpo primario.

4.7.3 Caracterización fenotípica de Células en proliferación

La caracterización fenotípica de las poblaciones celulares en proliferación se determinó mediante la coexpresión de BrdU junto a los marcadores (Tabla 1) específicos que caracterizan cada estadio de la diferenciación neural; proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y nestina para progenitores neurales, doblecortina (DCX) para neuroblastos y proteína nuclear neuronal (NeuN) para el reconocimiento de neuronas maduras (Fig. 9).

Las secciones de cerebros, fueron tratadas siguiendo el protocolo de inmunofluorescencia descrito anteriormente (Fig. 8). Los resultados serán reportados de manera cuantitativa mediante la identificación de células doblemente marcadas por región del cerebro.

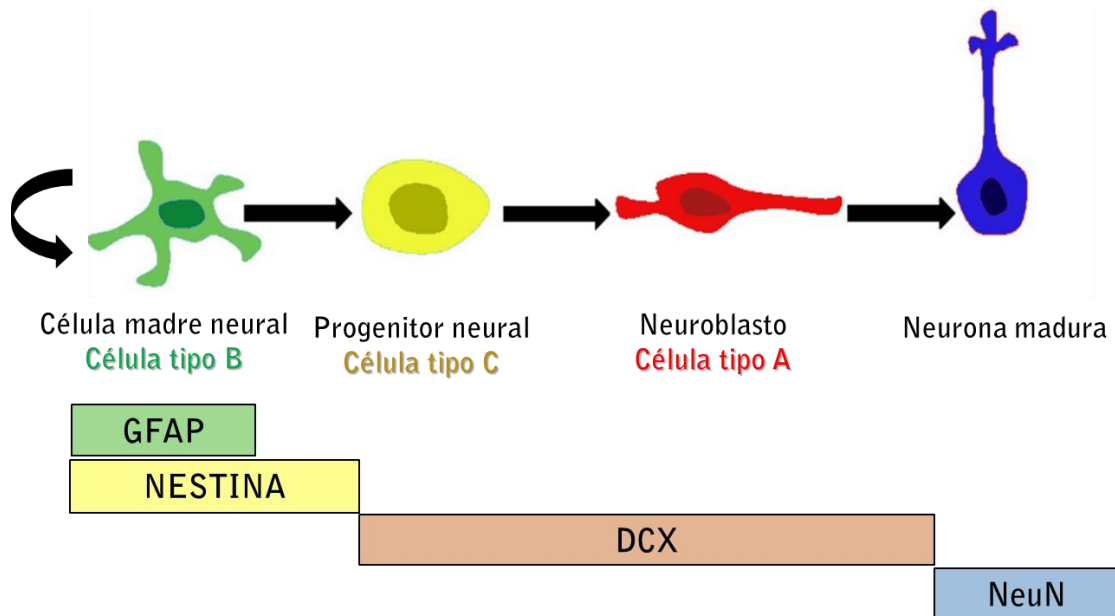


Figura 9. Esquema de diferenciación neuronal. Se observan los marcadores específicos que caracterizan cada estadio de diferenciación. (Kempermann, 2011)

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios usados en la caracterización fenotípica de células en proliferación.

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Concentración	Proteína diana	Marcador
Polyclonal Rabbit Anti-GFAP DaKoCytomation©	Anti-Rabbit Alexa Fluor 488	1:500	Proteína acídica fibrilar glial	Astrocitos / Célula madre tipo B
Monoclonal Mouse Anti-Nestina Millipore©	Anti- Mouse Alexa Fluor 594	1:500	Proteína de neurofilamentos	Progenitor neural
Polyclonal Guinea pig Anti-Doublecortin Millipore©	Anti-Ginea pig Alexa Fluor 594	1:300	Proteína de migración neuronal	Neuroblastos
Monoclonal Mouse Anti-NeuN Millipore©	Anti-Mouse Alexa Fluor 488	1:500	Proteína nuclear neuronal	Neuronas

4.8 Observación y cuantificación mediante microscopía de fluorescencia

Las inmunotinciones realizadas fueron visualizadas mediante el microscopio de Fluorescencia, donde se realizó la toma de imágenes digitales para la posterior cuantificación de células marcadas en las distintas áreas del cerebro.

5. RESULTADOS

5.1 Establecimiento de un modelo murino de desvascularización cortical

Durante el desarrollo de este estudio se estableció un modelo animal de isquemia mediante un paradigma de desvascularización cortical (Fig. 10). La cirugía genera una mortalidad máxima de un 15% de la muestra. Una vez que los animales se recuperaron de la anestesia, la administración de BrdU permitió determinar la proliferación celular en el cerebro ipsilateral y contralateral a los diferentes tiempos post-cirugía. La administración del mimético de timidina no afectó la sobrevivencia de los animales.

Para la determinación de los componentes celulares en proliferación y sus fenotipos se realizó la perfusión y fijación del tejido en los tiempos correspondientes, a los días 1, 4, 7, y 10, respectivamente. Obteniendo los cerebros fijados para su posterior corte y análisis.

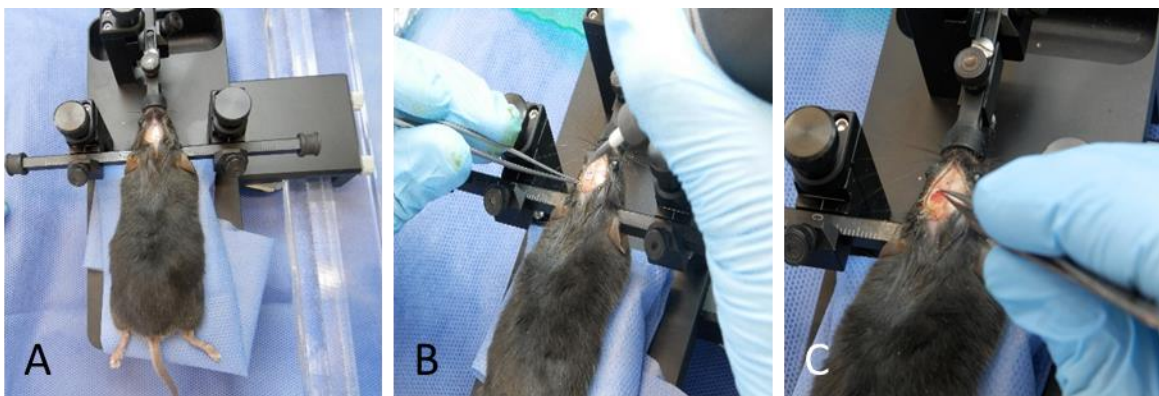


Figura 10. Desarrollo de modelo murino de desvascularización cortical (DC) en ratones C57BL/6. A. incisión en la piel que recubre el cráneo. B. Apertura de la ventana de 3 x 3 mm a 1 mm posterior desde bregma y 1 mm lateral desde la sutura interparietal. C. Retiro de las meninges, con ayuda de una pinza punta fina.

5.2 Determinación del volumen de lesión inducida por DC mediante tinción de Nissl

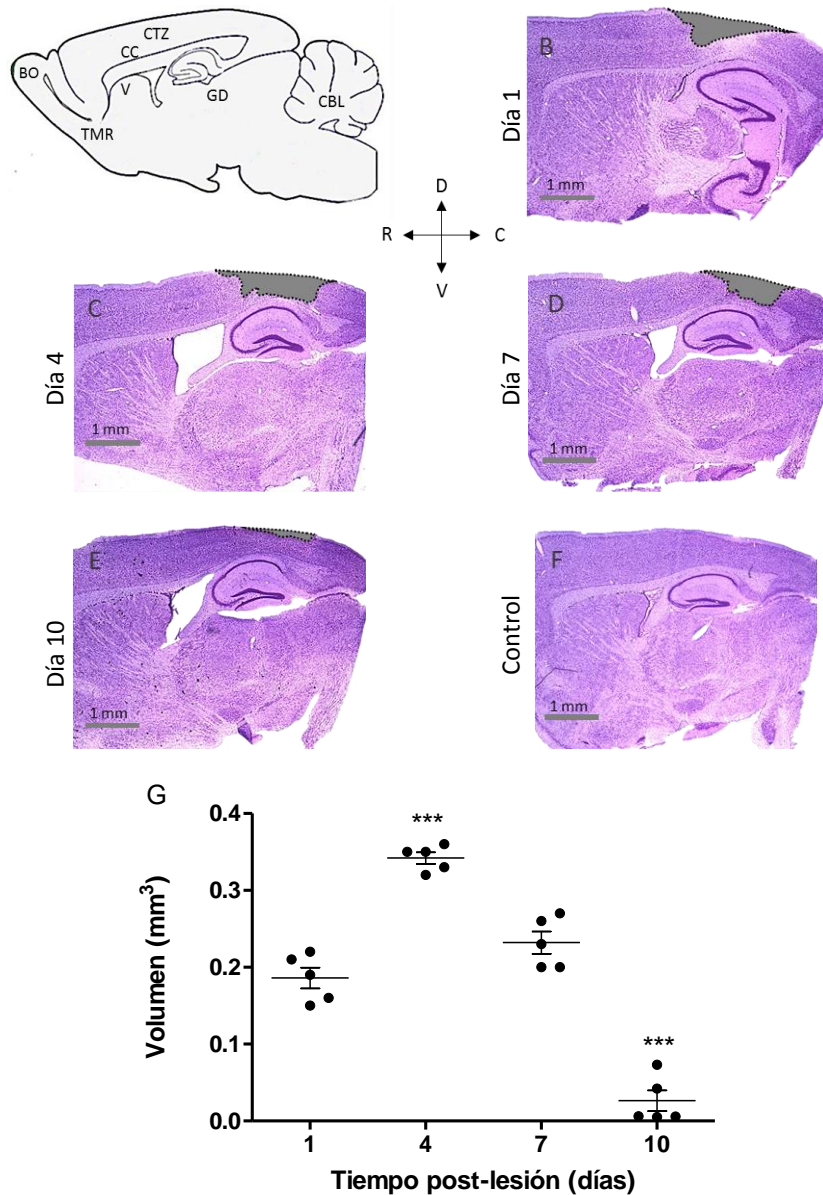


Figura 11. Determinación del volumen de lesión inducida por DC mediante tinción de Nissl. **A.** Esquema de un plano sagital de cerebro de ratón, orientado en dirección rostrocaudal, para facilitar la orientación se señalan algunas de sus estructuras: BO= bulbo olfatorio, CTZ= corteza parietal, V= ventrículo, GD= giro dentado, y CBL= cerebelo. **B-E.** Cortes sagitales de cerebro donde se estima el volumen de la lesión para cada tiempo experimental (1, 4, 7 y 10). **F.** Corte sagital correspondiente al control metodológico (animal operado, no lesionado). **G.** Determinación del volumen de lesión. Cada punto en la gráfica corresponde al promedio del volumen en cuatro cortes por animal, para un total de 5 animales para cada tiempo experimental.

Mediante el uso de esta tinción se pudo observar la citoarquitectura que describe la organización de los somas neuronales en las diferentes regiones del cerebro, que se encuentra perturbada cuando ocurre la lesión de la corteza cerebral.

El volumen de la lesión aumenta desde el primer día (Fig. 11-B) hasta el día 4 (Fig. 11-C) cuando alcanza su valor máximo (Fig. 11-G). Posteriormente al día 7 se reduce y alcanza un mínimo en el día 10 (Fig. 11-E). El control (Fig. 11-F) es un animal al que se le ha practicado la craneotomía, pero no se le removió las meninges, en consecuencia, este animal no presenta daño cortical, lo que sugiere que es un buen control metodológico.

Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), donde se comparó el volumen de lesión para cada uno de los tiempos experimentales. Se obtuvo una diferencia significativa con un valor $F [4] = 107,3$, $p < 0,0001$. La desvascularización produce un incremento del volumen de lesión que cambia significativamente en tiempo. Esta comparación se realizó con al menos 5 animales por grupo en experimentos independientes. Adicionalmente en un análisis post ANOVA se demostró que día 4 es mayor que 1, 7 y 10 con un valor de $p < 0.0001$ corrección de Bonferroni, y que el día 10 es menor que 1, 4 y 7 con un valor de $p < 0.0001$.

5.3 Estimación de la proliferación celular inducida por DC

La incorporación de BrdU al ADN permite estimar células en proliferación en diferentes zonas del cerebro. Se detectaron células BrdU⁺ en zonas neurogénicas clásicas; la ZSG del giro dentado (Fig. 12) y la ZSV de los ventrículos laterales (Fig. 13). Además se observaron células en proliferación a lo largo del TMR (Fig.14) y en la CTZ ipsilateral (Fig. 15). La observación detallada de estas zonas se describe a continuación.

5.3.1 Zona subgranular

En la figura 12 se describe la neurogénesis post-lesión en la ZSG ipsilateral (Fig. 12-B), la contralateral (Fig. 12-C) y la ZSG ipsilateral correspondiente al control metodológico (Fig. 12-D). En cada una de las imágenes se observan células BrdU⁺ (Rojo) a lo largo de toda la estructura. En cada experimento de inmunohistoquímica se incluyeron secciones de cada animal incubadas en ausencia de anticuerpo primario (Fig. 12-E) el cual corresponde al control negativo de la inmunofluorescencia, lo que nos indica que la señal positiva es real y específica.

La densidad de células BrdU⁺ se obtuvo luego de contar el número total de células en un volumen virtual generado por seis (6) cortes sagitales, de un mismo animal separados entre si 100µm. Los valores en las gráficas (Fig. 12-F y G) representan el promedio \pm desviación estándar, para cada tiempo post-lesión, para el hemisferio ipsilateral (Fig. 12-F) y el hemisferio contralateral (Fig. 12-G) de por lo menos tres animales lesionados y controles.

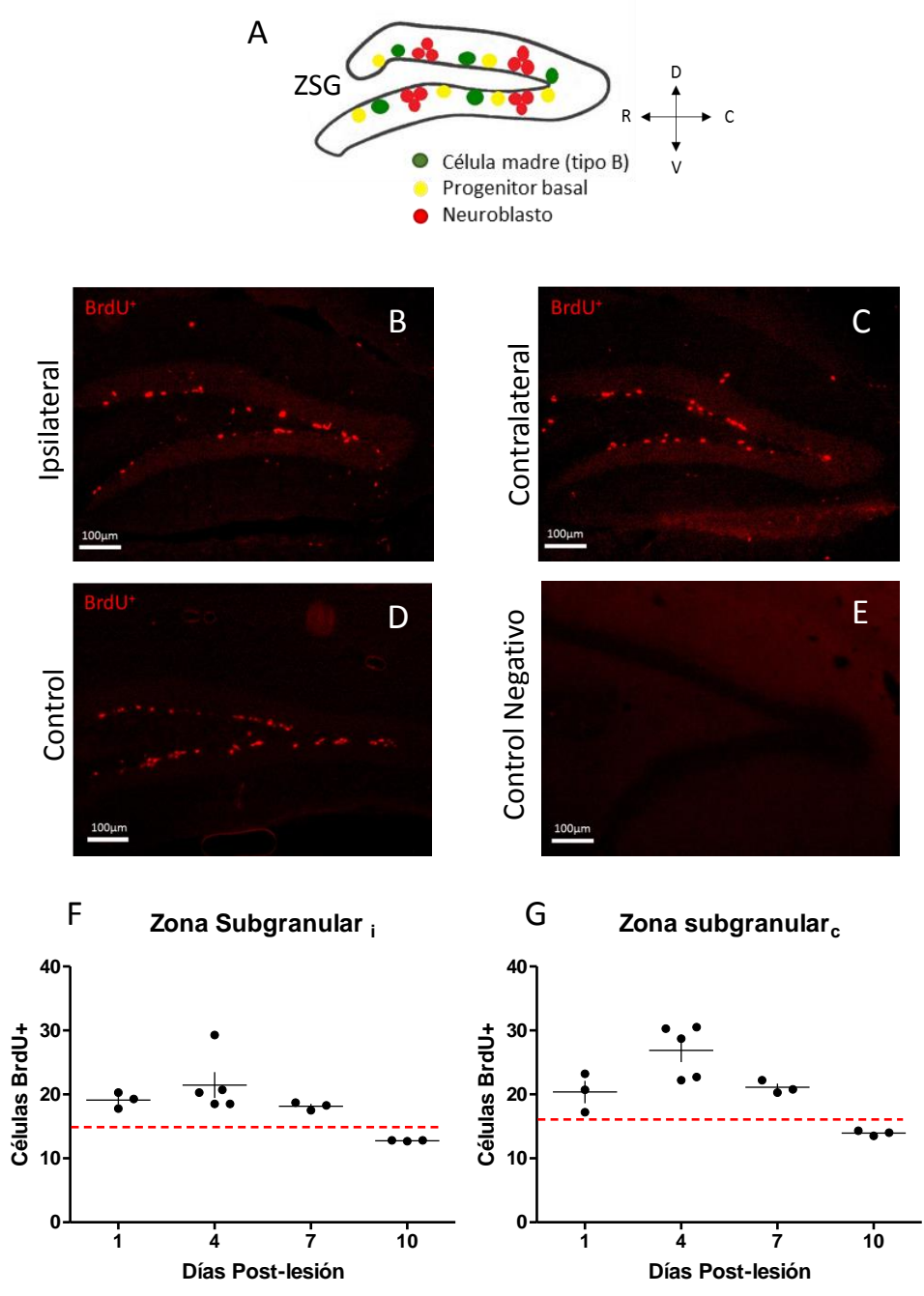


Figura 12. Neurogénesis post-lesión en la zona subgranular. **A** Esquema de la ZSG. **B**. ZSG ipsilateral. **C**. ZSG contralateral. **D**. Control experimental (animal operado, no lesionado). **E**. Control negativo de inmunofluorescencia. **F**. Gráfico de neurogénesis en la ZSG ipsilateral. **G**. Gráfico de neurogénesis en la ZSG contralateral. La franja negra corresponde al promedio \pm la desviación estándar. Cada punto en las gráficas representa un animal.

La línea discontinua roja en cada uno de los gráficos, corresponde al valor promedio de células BrdU⁺ en la ZSG de 4 animales control, uno para cada tiempo experimental. Debido a que estos animales no presentaron diferencias entre sí, se decidió reportar un valor único correspondiente al control.

El fenómeno de neurogénesis en la ZSG fue estudiado mediante tres análisis de varianza (ANOVA de dos vías), donde se comparó:

- El curso temporal en la ZSG_{lesionados/ipsi} vs ZSG_{controles/ipsi} $F [3,12] = 1,99$; $p= 0,15$
- El curso temporal en la ZSG_{lesionados/contra} vs ZSG_{controles/contra} $F [3,12] = 1,21$; $p= 0,33$
- El curso temporal en la ZSG_{lesionados/ipsi} vs ZSG_{lesionados/contra} $F [3,12] = 1,921$; $p= 0,17$

La intención del análisis fue comparar la neurogénesis en la ZSG de animales lesionados con respecto a la ZSG de animales controles, ya que cualquier diferencia en la neurogénesis puede ser producto de la lesión generada. En la gráfica correspondiente a la ZSG_{contra} (Fig. 12-G) se observa un incremento en el promedio de células al día 4 post-lesión, sin embargo, al realizar el análisis estadístico se obtuvo que dicho incremento no fue significativo, en comparación al control.

Además se comparó la neurogénesis entre hemisferios de los animales lesionados, comparando la ZSG ipsilateral y contralateral, donde tampoco se obtuvieron diferencias significativas.

5.3.2 Zona subventricular

En la figura 13 se ilustra la neurogénesis post-lesión en la ZSV ipsilateral y contralateral (Fig. 13-B y C) y la ZSV ipsilateral correspondiente al animal control (Fig. 13-D). La neurogénesis se puede evidenciar mediante la acumulación de células BrdU⁺ a lo largo de toda la pared del ventrículo y se extienden dorsalmente hacia el TMR. Estas células BrdU⁺ fueron cuantificadas y graficadas en función del tiempo, para el hemisferio ipsilateral (Fig. 13-F) y el hemisferio contralateral (Fig. 13-G).

La neurogénesis en la ZSG se estudió mediante tres análisis de varianza (ANOVA de dos vías), donde se comparó:

- El curso temporal en la $ZSV_{\text{lesionados/ipsi}}$ vs $ZSV_{\text{controles/ipsi}}$ $F [3,12] = 8,72$; $p=0,0009$
- El curso temporal en la $ZSV_{\text{lesionados/contra}}$ vs $ZSV_{\text{controles/contra}}$ $F [3,12] = 27,25$; $p=0,0001$
- El curso temporal en la $ZSV_{\text{lesionados/ipsi}}$ vs $ZSV_{\text{lesionados/contra}}$ $F [3,12] = 39,88$; $p<0,0001$

Se observa que existe un cambio en el curso temporal de la neurogénesis en la ZSV ipsilateral y contralateral, en comparación a sus respectivos controles. Dicho cambio se ve reflejado por un incremento en el promedio de células BrdU⁺ al día 4 post-lesión. Además, al realizar la comparación entre hemisferios, se obtuvo que este incremento es mayor en el hemisferio contralateral.

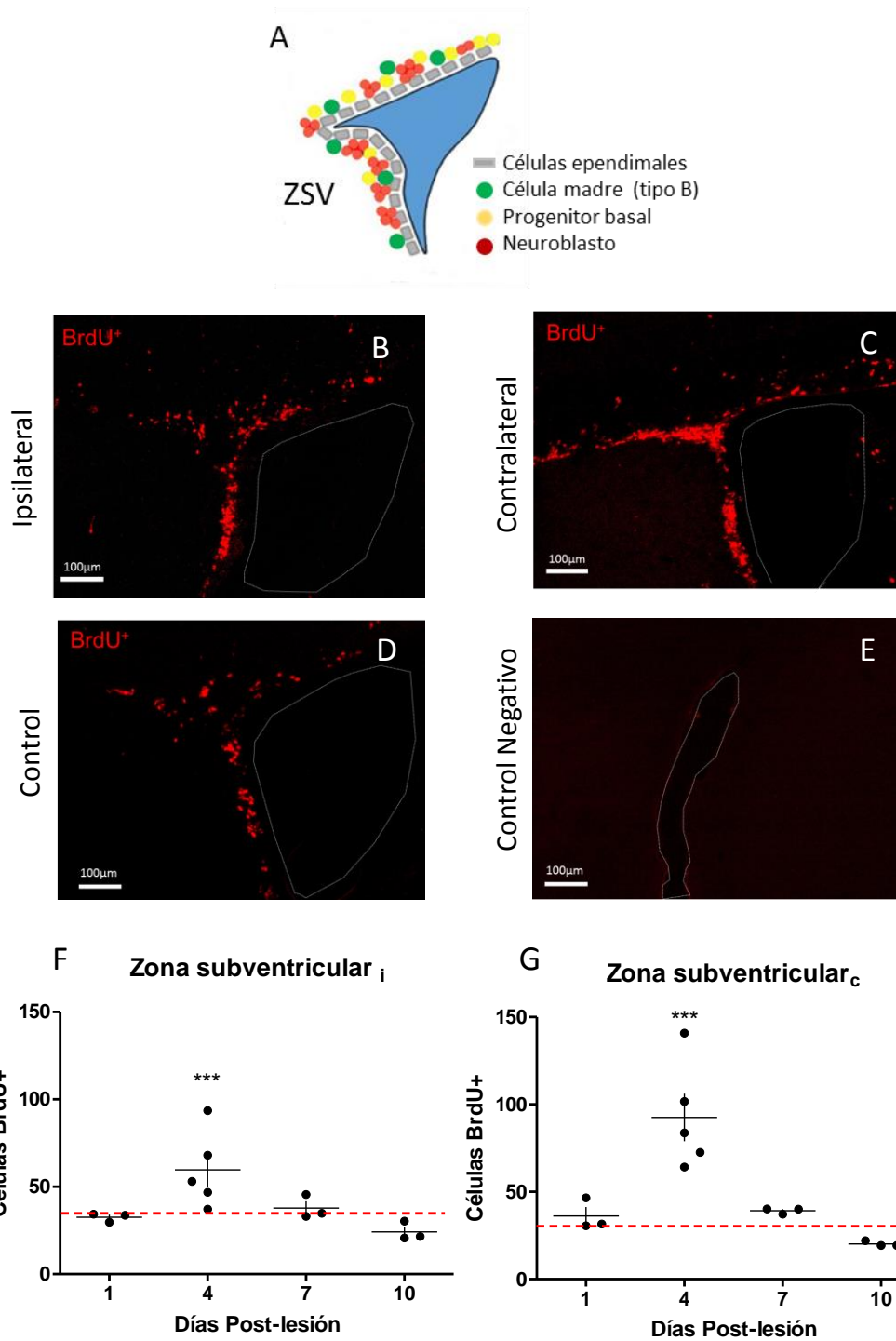


Figura 13. Neurogénesis post-lesión en la zona subventricular. A Esquema de la ZSV **B.** ZSV ipsilateral. **C.** ZSV contralateral. **D.** Control experimental (animal operado, no lesionado). **E.** Control negativo de inmunofluorescencia. **F.** Gráfico de neurogénesis en la ZSV ipsilateral. **G.** Gráfico de neurogénesis en la ZSV contralateral.

5.3.4 Torrente migratorio rostral

La Figura 14 se evidencia proliferación a lo largo del TMR, tanto en el hemisferio ipsilateral (Fig. 14-B), como en el contralateral (Fig. 14-C).

La neurogénesis en la ZSG se estudió mediante tres análisis de varianza (ANOVA de dos vías), donde se comparó:

- El curso temporal en la $TMR_{\text{lesionados/ipsi}}$ vs $TMR_{\text{controles/ipsi}}$ $F [3,12] = 15,8; p=0,0001$
- El curso temporal en la $TMR_{\text{lesionados/contra}}$ vs $TMR_{\text{controles/contra}}$ $F [3,12] = 29,24; p=0,0001$
- El curso temporal en la $TMR_{\text{lesionados/ipsi}}$ vs $TMR_{\text{lesionados/contra}}$ $F [3,12] = 19,33; p<0,0001$

En los gráficos (Fig. 14-F y G) es notorio un incremento estadísticamente significativo al día 4 post-lesión en ambos hemisferios, en comparación a los animales control (Fig. 14-D). Al realizar la comparación entre hemisferios, se encontró nuevamente que en el hemisferio contralateral existe una diferencia aun mayor que el hemisferio ipsilateral.

5.3.5 Corteza lesionada

El número de células BrdU+ en la corteza ipsilateral (Fig. 15-A) fue elevado con respecto al control (Fig. 15-C), que a pesar de no haber generado la lesión, presentan proliferación celular en la zona donde se hizo la craneotomía. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA de dos vías), donde se comparó el curso temporal en la $CTZ_{\text{lesionados/ipsi}}$ vs $CTZ_{\text{controles/ipsi}}$ $F [3,12] = 18,57; p<0,0001$, donde se confirma que la proliferación celular en corteza lesionada es mayor y estadísticamente significativa que la corteza control. No se realizó comparación con la corteza contralateral (Fig. 15-B) ya que no se observaron células en proliferación.

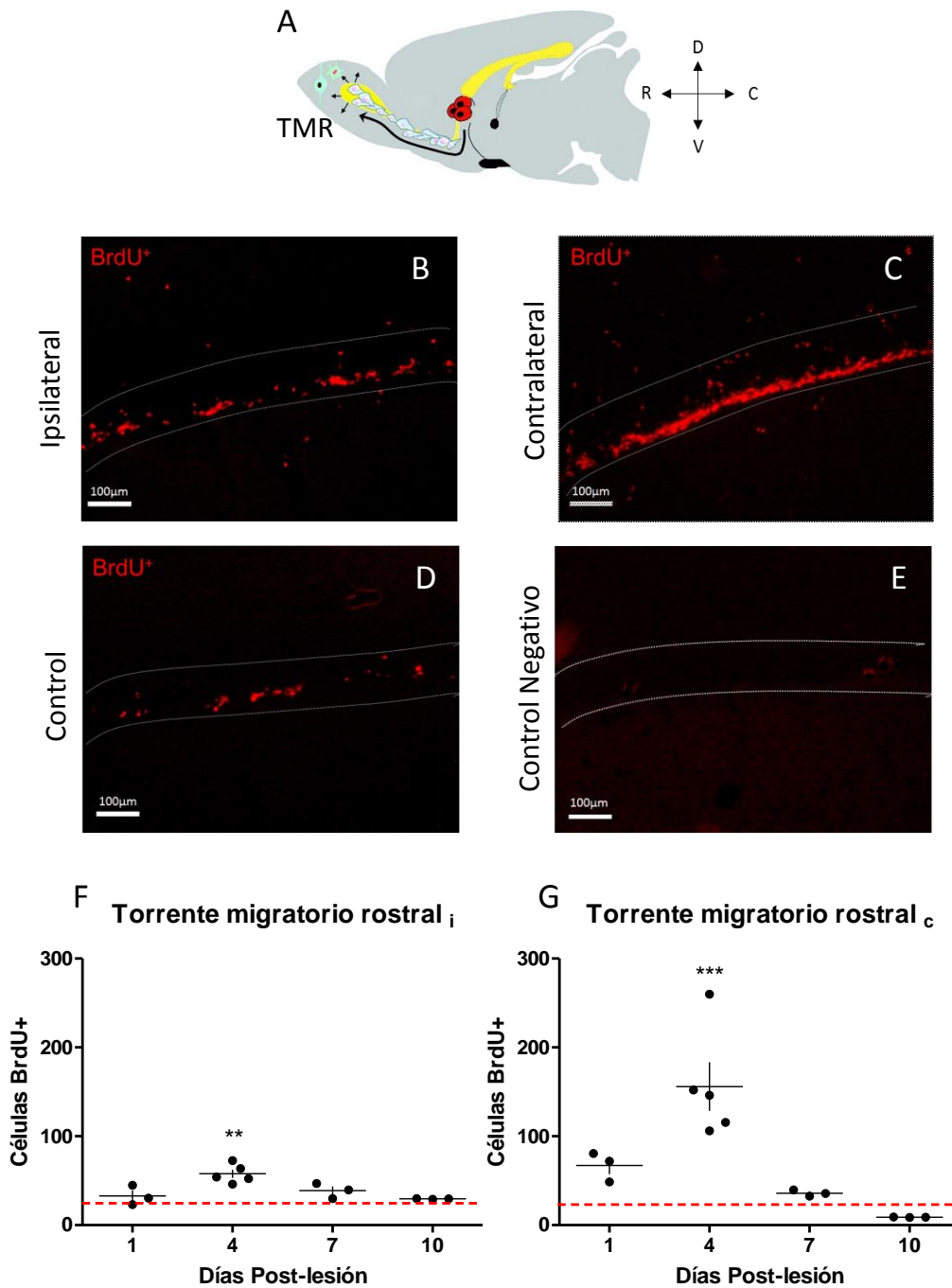


Figura 14. Proliferación celular post-lesión en el torrente migratorio rostral. A Esquema rostrocaudal del TMR **B.** TMR ipsilateral. **C.** TMR contralateral. **D.** Control experimental (animal operado, no lesionado). **E.** Control negativo de inmunofluorescencia. **F.** Gráfico de proliferación celular en el TMR ipsilateral. **G.** Gráfico de proliferación celular en el TMR contralateral.

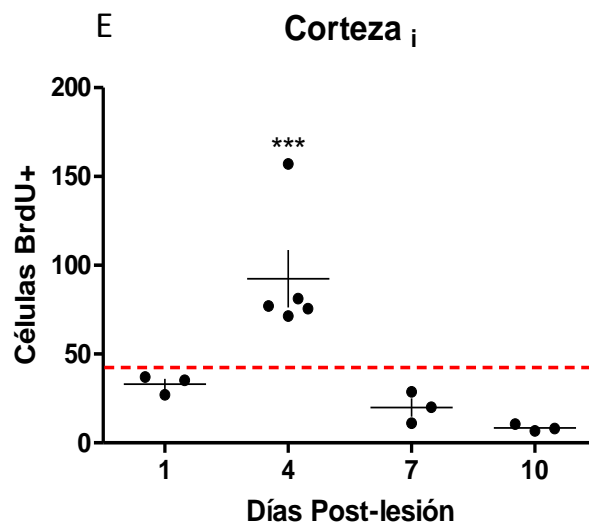
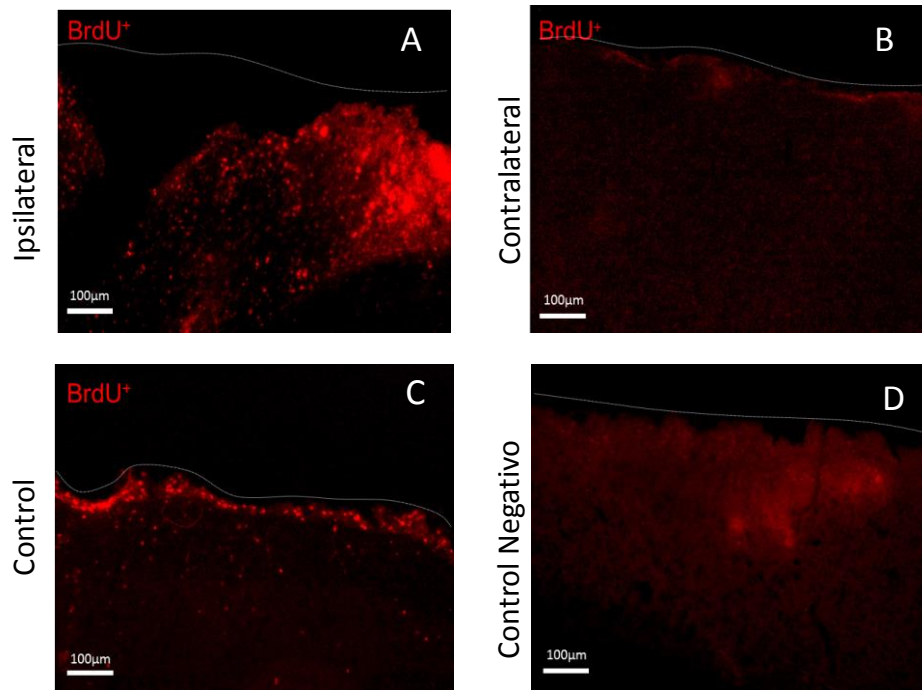


Figura 15. Proliferación celular post-lesión en la corteza lesionada. A. CTZ ipsilateral. **B.** CTZ contralateral. **C.** Control experimental (animal operado, no lesionado). **D.** Control negativo de inmunofluorescencia (CTZ lesionada). **E.** Gráfico de proliferación celular en la CTZ ipsilateral.

5.4 Caracterización fenotípica de las células que proliferan posterior a la DC

Una vez establecido el patrón de proliferación inducido por la DC se planteó caracterizar fenotípicamente la respuesta observada al día 4 post-lesión en las diferentes zonas estudiadas. Para esto se procedió a determinar el fenotipo de las células en proliferación haciendo uso de cada uno de los marcadores de expresión que describen el proceso de diferenciación de los progenitores neurales. La exploración de esta caracterización fenotípica se hizo usando como marcador primario BrdU y su localización con cada uno de los marcadores del linaje neural: GFAP (Fig. 16), nestina (Fig. 17) y doblecortina (DCX) (Fig. 18) en cada una de las zonas estudiadas.

Para ilustrar la caracterización fenotípica se presentarán tres figuras (16, 17 y 18), una para cada marcador utilizado. En cada una de estas figuras se encontrarán tres imágenes por cada zona estudiada, las dos primeras correspondientes a cada uno de los marcadores por separado y otra imagen correspondiente la combinación de ambos, siendo esta última, la representación del doble marcaje.

Se define como un doble marcaje a la superposición espacial de los dos marcadores de interés, en una zona en particular. En este trabajo se tomó como criterio de selección de una célula doble marcada, únicamente las células que se superponen núcleo con núcleo para ambos marcadores.

La figura 16 corresponde al doble marcaje de BrdU con GFAP; marcador de CMN o células tipo B.

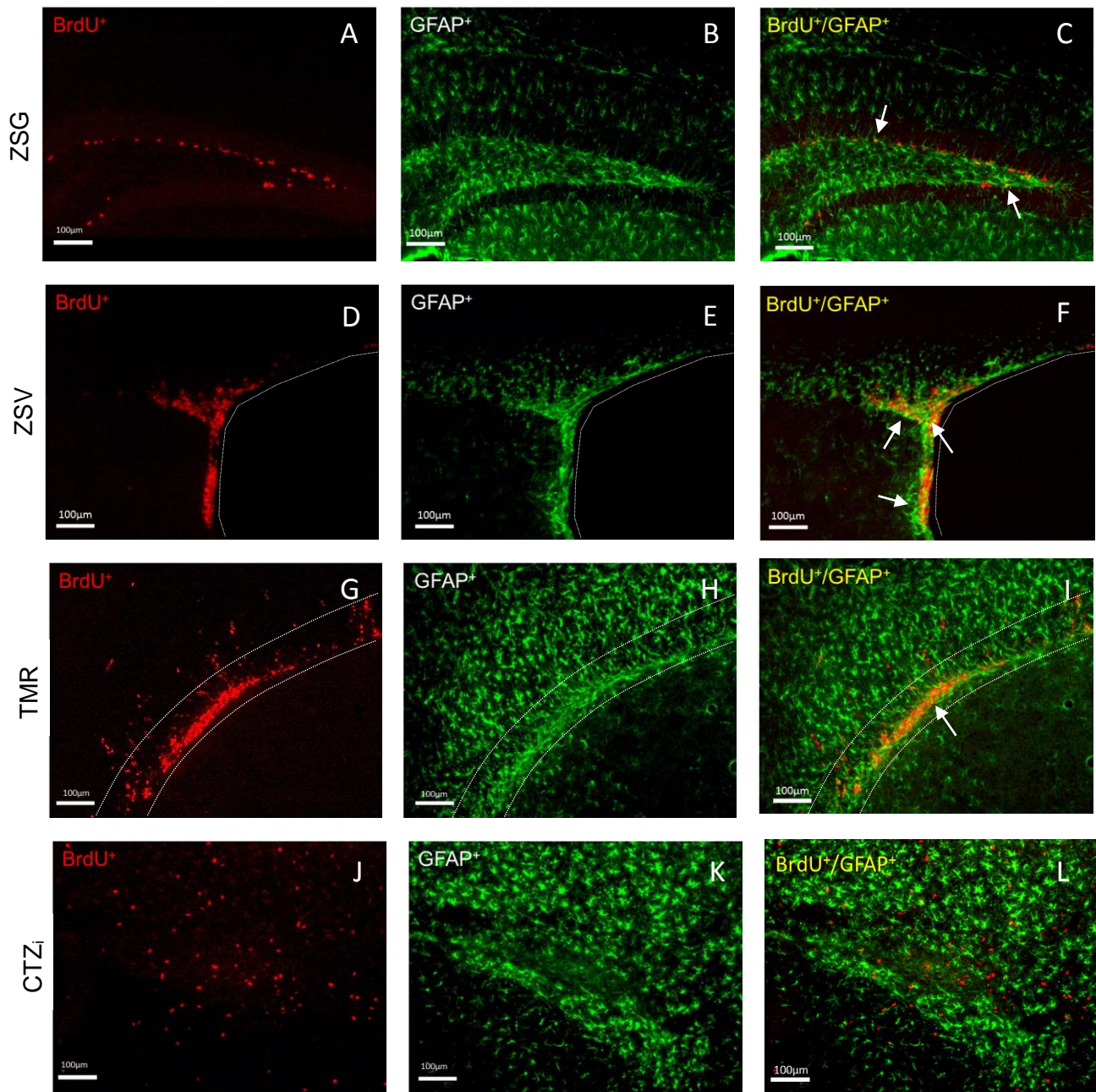


Figura 16. Coexpresión de BrdU con GFAP marcador de expresión de CMN. A. BrdU+ en la ZSG **B.** GFAP+ en la ZSG **C.** Coexpresión BrdU+/GFAP+ en la ZSG. **D.** BrdU+ en la ZSV **E.** GFAP+ en la ZSV **F.** BrdU+/GFAP+ en la ZSV **G.** BrdU+ en el TMR **H.** GFAP+ en el TMR **I.** BrdU+/GFAP+ en el TMR. **J.** BrdU+ en la CTZ_i **K.** GFAP en la CTZ_i **L.** BrdU+/GFAP+ en la CTZ_i.

En la Figura 16-A se observan células BrdU⁺ (rojo) a lo largo de toda la estructura de la ZSG. La Figura 16-B corresponde al marcaje de GFAP (verde) en la misma zona. La superposición de estas dos imágenes da como resultado (Fig. 16-C) el doble marcaje (amarillo) que corresponde a células BrdU⁺/GFAP⁺. Las células doblemente positivas corresponden a una célula madre neural en proliferación. Este mismo esquema de imágenes se repite para la ZSV, el TMR y la CTZ ipsilateral.

Es notable la presencia de células BrdU⁺/GFAP⁺ en las dos zonas neurogénicas clásicas (Fig. 16-C y F), La ZSG y ZSV, respectivamente.

En el TMR existe una gran cantidad de células en proliferación (Fig. 16-G), al observar el marcaje de GFAP en esta zona se encontró una gran densidad de astrocitos típicos del cerebro (Fig. 16-H) que dificultaron la visualización de células doblemente marcadas. A pesar de esta condición fue posible encontrar células doblemente positivas (Fig. 16-I). El número de células BrdU⁺/GFAP⁺ en el TMR es escaso en comparación con las zonas neurogénicas clásicas.

Por otro lado, en la CTZ ipsilateral donde existe una proliferación celular significativa (Fig. 16-L) puede evidenciarse que no se observan células BrdU⁺ que coexpresen con el marcador GFAP.

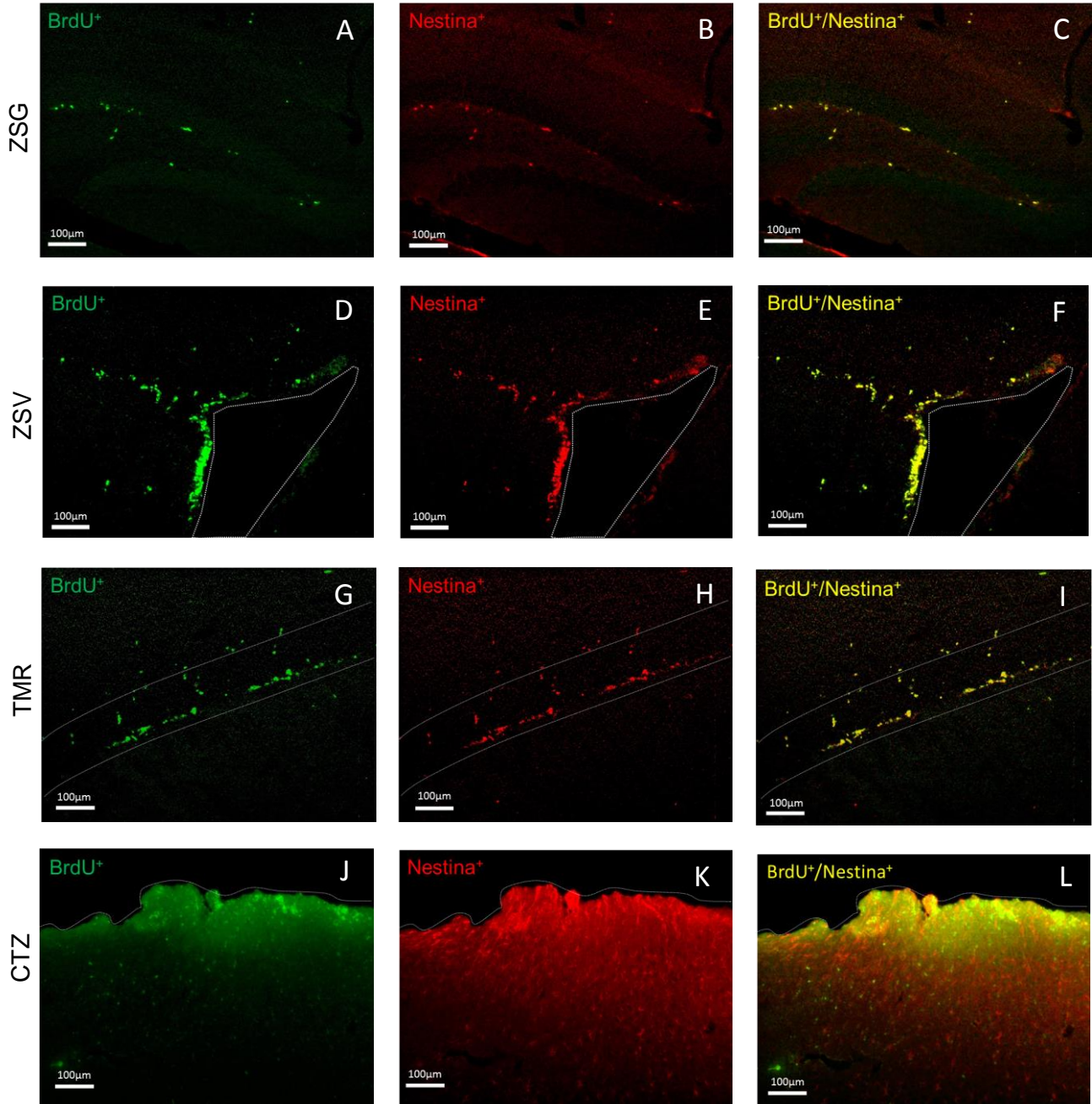


Figura 17. Coexpresión de BrdU con Nestina, marcador de expresión de CMN y PN.
A. BrdU+ en la ZSG **B.** Nestina+ en la ZSG **C.** BrdU+/Nestina+ en la ZSG. **D.** BrdU+ en la ZSV **E.** Nestina+ en la ZSV **F.** BrdU+/Nestina+ en la ZSV **G.** BrdU+ en el TMR **H.** Nestina+ en el TMR **I.** BrdU+/Nestina+ en el TMR. **J.** BrdU+ en la CTZ **K.** Nestina+ en la CTZ **L.** BrdU+/Nestina+ en la CTZ.

El segundo marcador de expresión utilizado para la caracterización fenotípica fue Nestina (Fig. 17). Se realizó la superposición de BrdU (verde) y Nestina (rojo) donde se obtuvo las células que coexpresan ambos marcadores BrdU⁺/Nestina⁺ (amarillo). Estas células doblemente marcadas corresponden a PN proliferando. Es notable (Fig. 17 A-I) que existe un 100% de coexpresión en la ZSG, ZSV y el TMR, a diferencia de la CTZ ipsilateral (Fig. 17 J-L) donde no se observaron células BrdU⁺/Nestina⁺.

El siguiente marcador fenotípico utilizado fue Doblecortina (DCX), proteína de migración neuronal (Fig. 18). En la figura se puede evidenciar la presencia de células BrdU⁺/DCX⁺ en cada una de las cuatro zonas estudiadas.

Una vez realizada todas las coexpresiones, se procedió a cuantificar el número total de células doblemente positivas para cada marcador y se graficó para cada zona estudiada en ambos hemisferios del cerebro (Figs. 19, 20, 21 y 22).

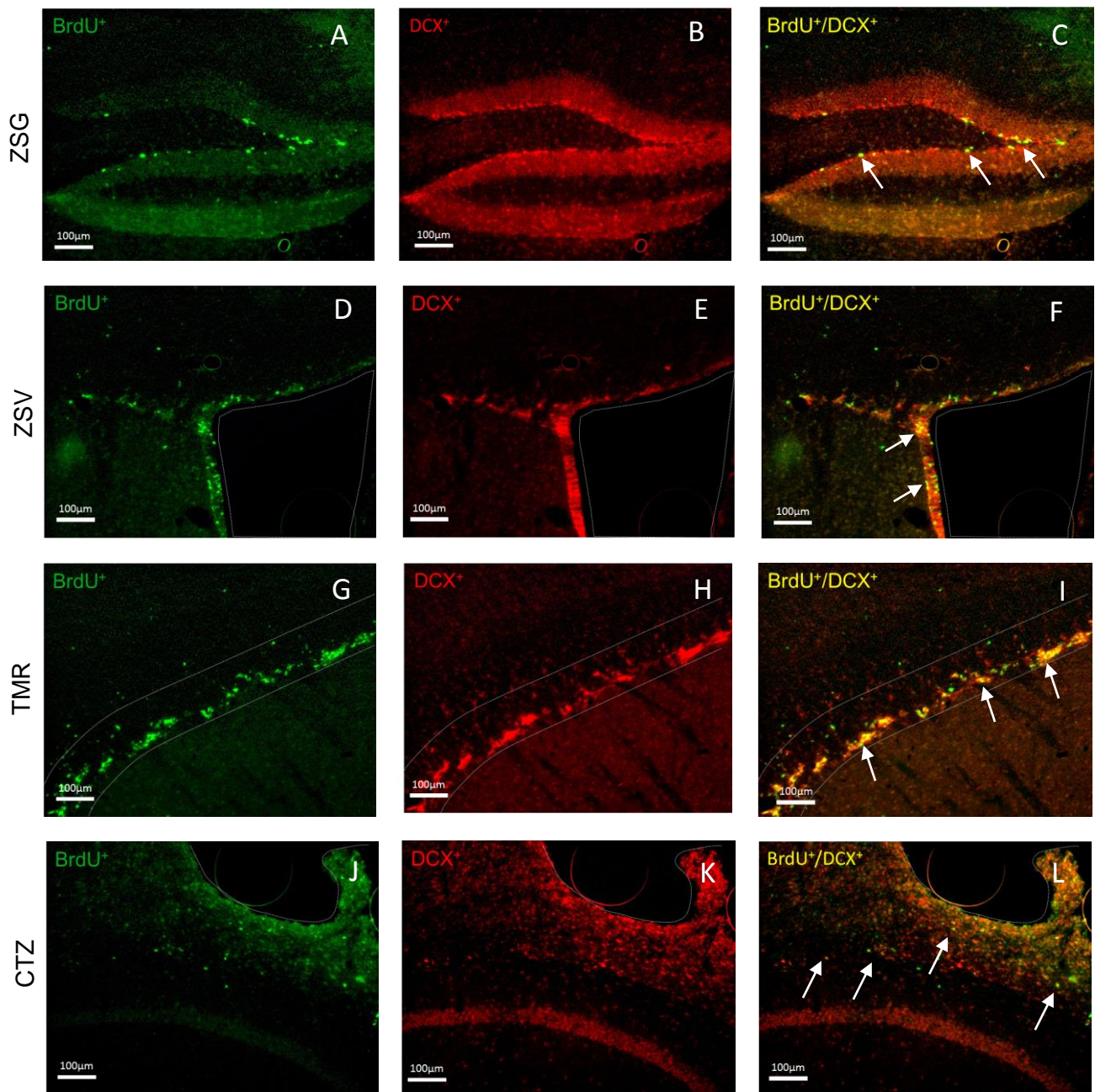


Figura 18. Coexpresión de BrdU con DCX, marcador de expresión de neuroblastos. A. BrdU+ en la ZSG B. DCX+ en la ZSG C. BrdU+/DCX+ en la ZSG D. BrdU+ en la ZSV E. DCX+ en la ZSV F. BrdU+/DCX+ en la ZSV G. BrdU+ en el TMR H. DCX+ en el TMR I. BrdU+/DCX+ en el TMR. J. BrdU+ en la CTZ K. DCX+ en la CTZ L. BrdU+/DCX+ en la CTZ.

En la figura 19 se reporta la caracterización fenotípica para la ZSG. Para generar este resultado se contó el número total de células doblemente positivas en seis (6) cortes sagitales por animal, para un total de 4 animales. En el gráfico (Fig. 19-D) se representa con cada barra el promedio de células doblemente positivas para cada marcador, en cada uno de los hemisferios del cerebro.

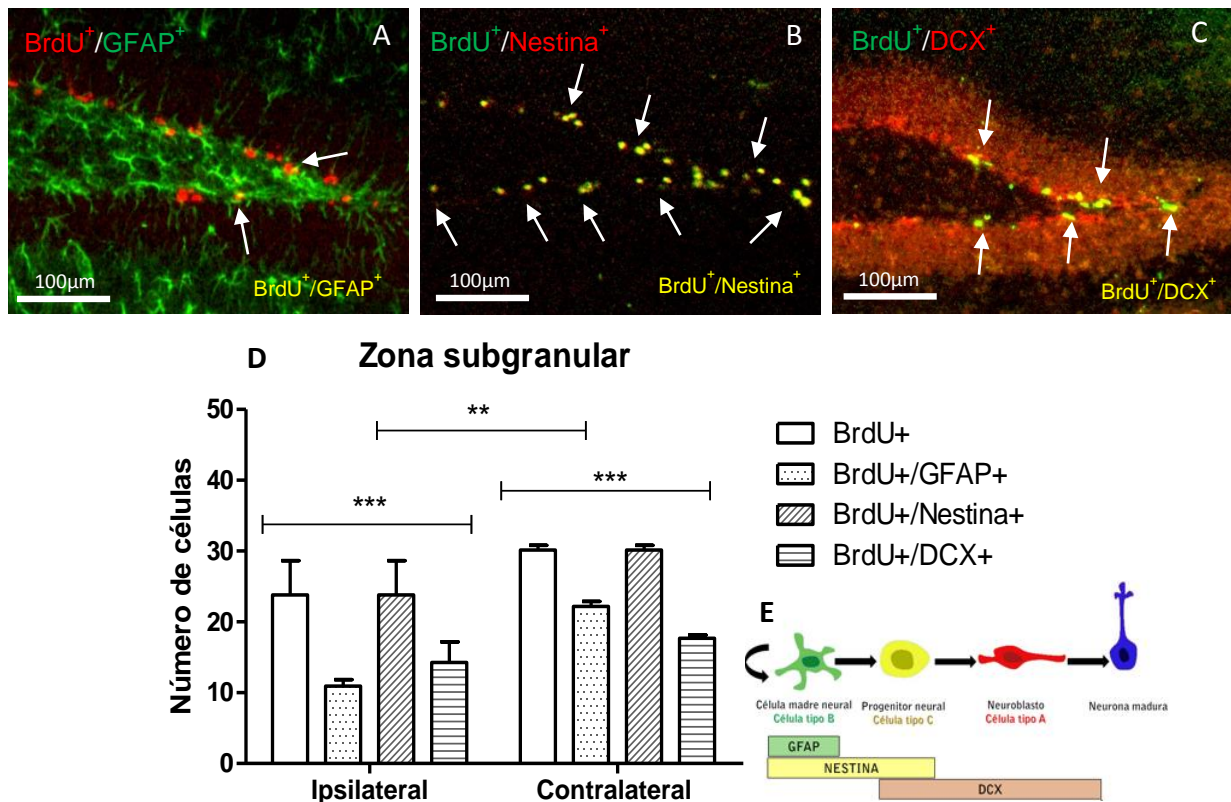


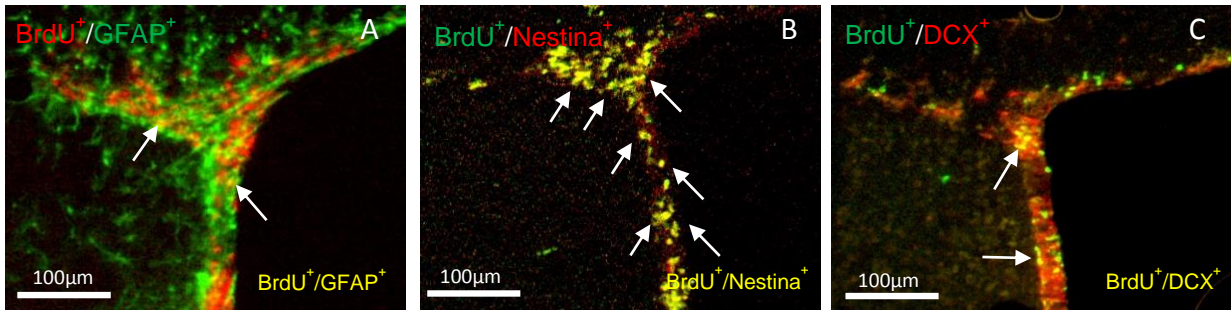
Figura 19. Caracterización fenotípica de células en proliferación en la ZSG

A. BrdU⁺/GFAP⁺ **B.** BrdU⁺/Nestina⁺ **C.** BrdU⁺/DCX⁺ **D.** Gráfico representativo de la cuantificación de marcadores en la ZSG ipsilateral y contralateral. **E.** Esquema de los marcadores de expresión del linaje neural.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA de dos vías) para comparar el valor relativo entre cada marcador en un mismo hemisferio y la diferencia entre cada hemisferio. Donde se obtuvo que existen diferencias significativas $F [3,24]=10,65$; $P < 0,0001$ entre los distintos marcadores para cada hemisferio por separado, siendo Nestina el marcador con mayor número de células que coexpresan con BrdU, seguido por DCX y por último GFAP.

Al comparar entre hemisferios se encontró que en el contralateral existe mayor número de células para cada uno de los marcadores, en comparación con el hemisferio ipsilateral con un $F [1,24]=12,96$; $P < 0,0001$.

El mismo análisis se realizó para la ZSV (Fig. 20) y TMR (Fig. 21). En la ZSV se observaron diferencias entre los fenotipos $F [3,24]=7,27$; $P=0,0001$ y nuevamente existe diferencias entre los hemisferios, siendo el contralateral el hemisferio con un mayor número de células, con respecto al ipsilateral $F [1,24]= 8,44$; $P=0,007$. Un resultado similar se obtuvo para el TMR, donde igualmente existen diferencias entre cada uno de los marcadores $F [3,24]= 193,44$; $P < 0,0001$ y entre hemisferio $F [1,24]= 690,64$; $P < 0,0001$, es notable en el gráfico (Fig. 21-D) que para el TMR las diferencias son mayores que en la ZSG y ZSV.



D Zona subventricular

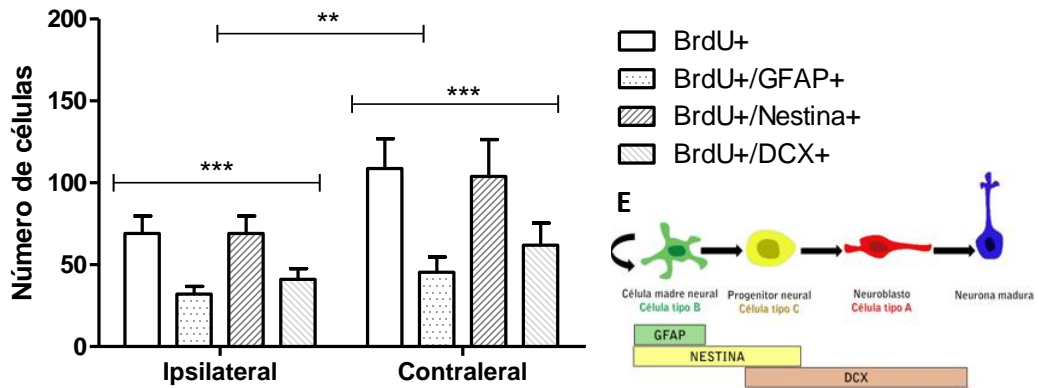


Figura 20. Caracterización fenotípica de células en proliferación en la ZSV

A. BrdU⁺/GFAP⁺ **B.** BrdU⁺/Nestina⁺ **C.** BrdU⁺/DCX⁺ **D.** Gráfico representativo de la cuantificación de marcadores en la ZSV ipsilateral y contralateral. **E.** Esquema general de los marcadores de expresión del linaje neural.

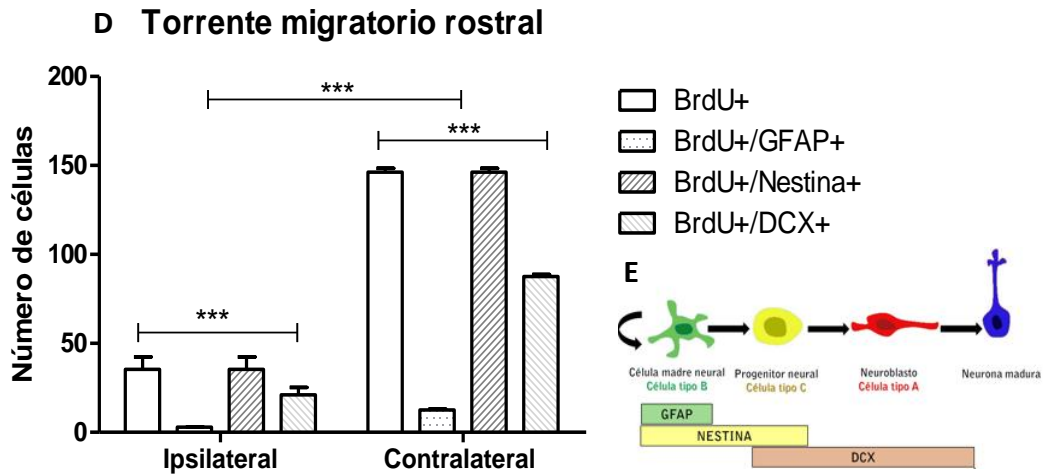
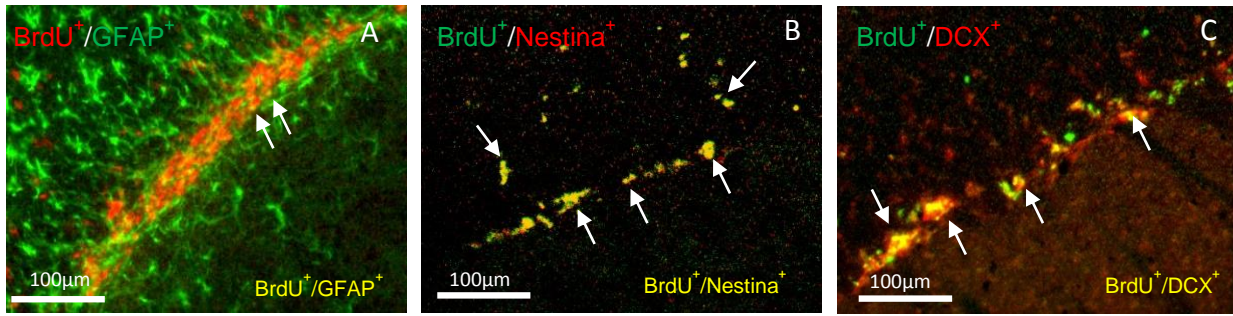


Figura 21. Caracterización fenotípica de células en proliferación en el TMR.
A. BrdU⁺/GFAP⁺ **B.** BrdU⁺/Nestina⁺ **C.** BrdU⁺/DCX⁺ **D.** Gráfico representativo de la cuantificación de marcadores en el TMR ipsilateral y contralateral. **E.** Esquema general de los marcadores de expresión del linaje neural.

Al realizar la caracterización fenotípica de las células que proliferan en la corteza ipsilateral no se encontró coexpresión de células para los marcadores GFAP y Nestina, Sin embargo sí se obtuvo coexpresión de BrdU con DCX, marcador de neuroblastos. En la figura 22 se ilustra la coexpresión para estos dos marcadores, donde se observa que del 100% de células en proliferación encontradas en la zona isquémica existe por lo menos un 20% de neuroblastos.

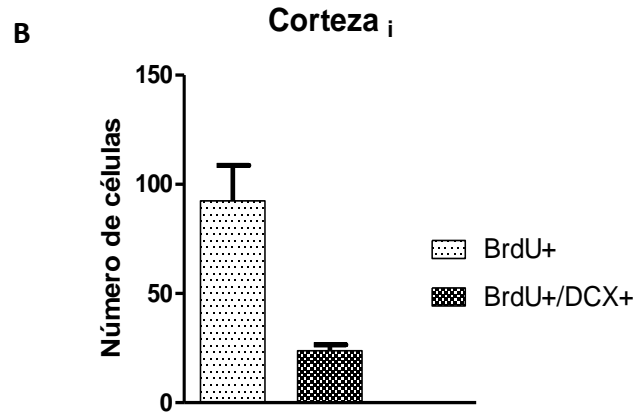
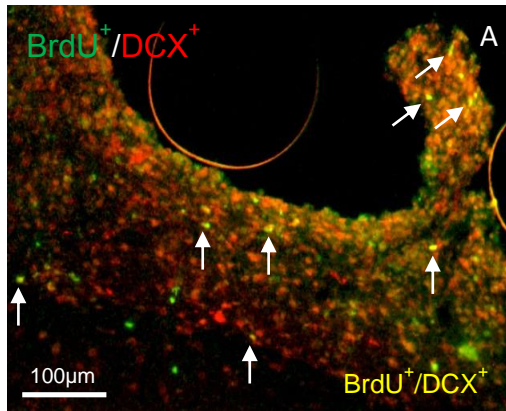


Figura 22. Neuroblastos en la corteza lesionada. **A.** Coexpresión de BrdU (verde) y DCX (rojo). **B.** Gráfico representativo de la cuantificación de células BrdU⁺/DCX⁺ en la corteza lesionada.

6. DISCUSIÓN

La neurogénesis ocurre principalmente en dos regiones discretas del cerebro adulto, la **ZSV** de los ventrículos laterales (Altman y Das, 1965; Luskin y col., 1993) y la **ZSG** del giro dentado (Kaplan y col., 1977; Alvarez-Buylla y col., 2001). En estas dos zonas se han descrito la presencia de CMN que residen en estructuras especializadas llamados nichos neurogénicos. Los nichos neurogénicos constituyen un espacio tridimensional complejo en donde existen interacciones celulares y señales microambientales intrínsecas (p.ej. interacción célula-célula, liberación local de neurotransmisores) y extrínsecas (p.ej. factores de crecimiento, aferentes de sistemas de neurotransmisores, citoquinas, hipoxia) que son fundamentales en la regulación de la neurogénesis en condiciones normales, y que son de suma importancia para la interpretación y justificación de los resultados en este modelo animal de ACV.

La lesión por desvascularización cortical unilateral que se practicó en este modelo induce una pérdida de la laminación cortical. Esto se traduce en la muerte celular de diversos grupos neuronales, y además la pérdida de la inervación colinérgica cortical en el hemisferio ipsilateral que provoca una degeneración retrograda de las proyecciones colinérgicas de largo alcance que se originan en el núcleo basal de Meynert, y que inervan la corteza cerebral (Sofroniew y col., 1983).

Debido a esta característica morfofisiológica le damos importancia a la regulación neuroquímica de los nichos neurogénicos. Cuando se genera la lesión por DC en ratones C57BL/6, y se estudia como variable dependiente el proceso de neurogénesis, medido a través de la detección de células BrdU⁺ como un indicador

de proliferación, se observa marcaje en la ZSG y ZSV, el TMR y la corteza cerebral lesionada. Dicha proliferación celular ocurrió de manera bilateral.

6.1 Neurogénesis post-lesión en zonas neurogénicas clásicas

La neurogénesis en la ZSV mostró un aumento significativo al día cuatro (4) post-lesión, en contraste con la ZSG donde no hubo cambios significativos. A pesar de que existen similitudes en la composición celular de cada uno de los nichos en estas zonas, la diferencia en la neurogénesis puede deberse a que la arquitectura celular y el microambiente de cada uno de los nichos difiere, siendo el nicho ZSV mucho más complejo. Debido a esa complejidad, el nicho está sujeto a una mayor regulación que se ve reflejada en el aumento de la neurogénesis.

En ambos nichos neurogénicos existen células madre de división lenta (células GFAP⁺/Nestina⁺) que dan lugar a células progenitoras, (GFAP⁻/Nestina⁺) estas se dividen rápidamente y generan a los neuroblastos (PSA-NCAM⁺/DCX⁺) que se incorporan a circuitos neuronales en el cerebro adulto (Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002; Doetsch, 2003). En los últimos años se ha descrito la presencia de una subpoblación de células microgliales (IBA-1⁺) en los nichos neurogénicos de la ZSG y ZSV, y aunque se desconoce cuál es la interacción de estas células con los componentes de nicho, se propone que la microglía ejerce un papel importante en el proceso de neurogénesis en condiciones patológicas (Ek Dahl y col., 2009; Molina-Holgado y Molina-Holgado, 2010; Russo y col., 2011; Sierra y col., 2010) ya que las células microgliales posiblemente estén involucradas en el desarrollo de la estructura y función de las espinas dendríticas y el ambiente perisináptico, ambas

funciones importantes para que una neurona nueva desarrolle conexiones apropiadas en el cerebro adulto (Ekdahl, 2012).

Existe otra característica importante que es común para ambos nichos, y es la presencia de una red de capilares sanguíneos que se comunican con las CMN en estos sitios (Codega y col., 2014; Kokovay y col., 2012). Por lo tanto, las CMN tienen acceso a factores presentes en el torrente sanguíneo, incluyendo citoquinas circulantes, quimiocinas y factores de crecimiento (revisado por, Lin y Iacovitti., 2015).

Una diferencia importante es que la ZSV (Fig. 2) contiene a lo largo de la pared del ventrículo múltiples células ciliadas, llamadas células endodimales. Dichos cilios están en contacto constante con el LCR. Por otro lado, la célula madre tipo B residente de la ZSV presenta proyecciones que atraviesan la capa de células endodimales, lo que también le permite estar en contacto con el LCR, por lo que, se les hace posible sentir cualquier cambio que ocurra en el LCR, por ejemplo: factores de crecimiento (NGF, BDNF), neurotransmisores (acetilcolina, glutamato, dopamina), citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, INF γ y TNF α), concentración de proteínas (SDF1), y concentración de O₂ y Glucosa (Gross y col., 1996; Lim y col., 2000; Liu y col., 2002). En contraste a esto, en el nicho de la ZSG (Fig. 3) no existe ninguna célula que pueda estar en contacto con el ventrículo (Fuentealba y col., 2012).

Desde el punto de vista de la interacción de neurotransmisores en el nicho, se ha descrito en los últimos años la existencia de células colinérgicas (ChAT⁺) que sintetizan y liberan acetilcolina en la ZSV. Esta subpoblación de células colinérgicas se encuentran ubicadas en la capa subependimal del ventrículo y presentan una morfología diferente a las células colinérgicas residentes del cuerpo estriado (Páez-González y col., 2014). La manipulación optogenética *in vivo* de estas neuronas colinérgicas reveló que su actividad es necesaria y suficiente para modular la proliferación neurogénica en la ZSV, ya que las CMN pueden responder a la liberación de acetilcolina e incrementar la producción de neuroblastos. (Páez-González y col., 2014). La presencia de células colinérgicas en el nicho subventricular ejerce un papel importante en la regulación neurogénesis en el cerebro adulto y sugiere la posibilidad de modular las capacidades neuroregenerativas en condiciones de daño. Sabiendo estas diferencias, se puede decir que la ZSV presenta una mayor sensibilidad a los cambios fisiológicos y neuroquímicos que se traducen en un aumento en la neurogénesis, en comparación con la ZSG.

6.2 Proliferación en el TMR

Otra observación importante en nuestro estudio fue encontrar una alta proliferación celular a lo largo de todo el TMR (Fig.14) en ambos hemisferios del cerebro. Esta cantidad de células en el TMR se debe a que en condiciones normales, los neuroblastos que son generados en la ZSV migran a lo largo del TMR y terminan en el BO, donde se diferencian en varios tipos de interneuronas

especializadas para funciones olfatorias (Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002; Doetsch, 2003).

6.3 Neurogénesis contralateral

Trabajos previos han reportado neurogénesis bilateral posterior a una isquemia cerebral. Spiegler y colaboradores en el año 2007 luego de generar una isquemia global en cerebro de ratas adultas, mediante la electrocoagulación de la arteria cerebral media y la oclusión temporal de la arteria carótida, obtuvieron un aumento significativo de la neurogénesis en la ZSV y ZSG con respecto al animal control no lesionado (naive). Sumado a este resultado, encontraron que dicha neurogénesis ocurría de forma bilateral, siendo la neurogénesis ipsilateral mayor que la neurogénesis contralateral (Spiegler y col., 2007). Nuestros resultados difieren a los de este trabajo, ya que si bien encontramos que el fenómeno de neurogénesis post-lesión es bilateral, la diferencia es que nosotros hemos encontrado que el hemisferio contralateral presenta una mayor neurogénesis con respecto al hemisferio ipsilateral.

Este resultado puede deberse a la fisiología de nuestra lesión. La lesión por desvascularización cortical es una lesión focal y restringida a una zona específica del cerebro. Se sabe que a consecuencia de ella, se genera toda la cascada isquémica típica de una lesión cerebral, y sumado a esto, induce la pérdida de los terminales colinérgicos corticales en el hemisferio ipsilateral y la degeneración retrograda de las proyecciones colinérgicas de largo alcance que se originan en el núcleo basal de Meynert. Dicha degeneración ocurre solo en el hemisferio

ipsilateral, por lo que el contralateral se mantiene saludable (Fig. 23) (Sofroniew y col., 1983).

Esta última característica puede ser muy importante para la explicación de este resultado, ya que se sabe que la regulación de la neurogénesis es mediada en gran parte por neurotransmisores. En este caso en particular, la acetilcolina es de suma importancia, ya que se sabe que las CMN de la ZSV responden localmente al aumento en la concentración acetilcolina, y que esa respuesta se ve reflejada en un aumento en la producción de neuroblastos (Páez-González y col., 2014) y posiblemente al estar deprimido el sistema colinérgico ipsilateral, la neurogénesis en dicho hemisferio se ve disminuida, con respecto al hemisferio contralateral que conserva sano su sistema colinérgico y se observa una neurogénesis aumentada.

Estudios previos han reportado que la pérdida de las neuronas colinérgicas en el cerebro adulto conduce a una reducción en la proliferación celular en la ZSG del giro dentado. (Mohapel y col., 2005; Van Kampen y Eckman, 2010).

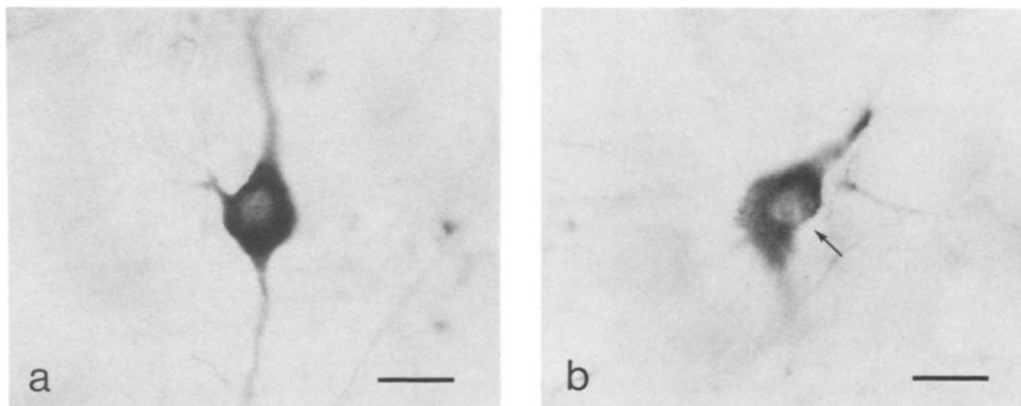


Figura 23. Daño colinérgico en el núcleo basal de meynert producto de la desvascularización cortical. Inmunohistoquímica de ChAT a) Neurona colinérgica sana en hemisferio contralateral. b) Neurona colinérgica atrofiada en el hemisferio ipsilateral. Tomado de Sofroniew y Col., 1983.

Por otro lado, un estudio donde fue manipulada farmacológicamente la señalización mediada por acetilcolina, revelaron que la activación de los receptores muscarínicos M1 conduce a un aumento en la proliferación de la ZSG, mientras que la activación de los receptores nicotínicos tuvo un efecto inverso (Van Kampen y Eckman, 2010).

6.4 Corteza ipsilateral

El principal propósito de este trabajo fue conocer cómo es el proceso de neurogénesis en condiciones de daño, ya que las CMN podrían ofrecer una potencial alternativa terapéutica ante un ACV. Dicha alternativa sería promover la recuperación del tejido nervioso mediante mecanismos propios que promuevan el reemplazo de las neuronas afectadas. Por esta razón, en nuestro trabajo hizo seguimiento a los cambios ocurridos en la corteza lesionada. Hemos encontrado tres observaciones importantes: la disminución del volumen de lesión, células en proliferación en la zona lesionada y la presencia de nuevos neuroblastos.

6.4.1 Disminución del volumen lesión

Es conocido que luego de una lesión cerebral ocurren múltiples procesos degenerativos que conllevan a la muerte celular en la zona donde ocurrió el daño. En nuestro trabajo hemos medido el volumen del daño en el tiempo, con ayuda de la tinción histoquímica de Nissl, el cual permitió la visualización de la zona dañada. Se reportó una importante disminución del volumen de la lesión al día 10 post-lesión (Fig.11). Dicha observación genera la interrogante de qué podría estar pasando en la zona de daño que provoca tal disminución de la lesión.

Una respuesta intuitiva sería que la disminución del volumen del daño se deba a la fibrosis tisular o cicatrización como ocurre en la mayoría de los órganos del cuerpo. Con respecto a este proceso el SNC es especial, ya que las células fibrogénicas se limitan al plexo vascular y a los nichos meníngeos y están separadas por la barrera hematoencefálica (BHE), sin embargo, la alteración de la BHE y el proceso inflamatorio post-lesión provoca un proceso de gliosis (Fig. 24) y la generación de una cicatriz glial, esta cicatriz se compone de astrocitos hipertróficos que sellan el tejido neural en la zona de daño (Fernandez-Klett y Priller, 2014). Junto a este proceso de gliosis, ocurre la microgliosis. La microglía es una célula inmunocompetente residente del SNC, la cual ejerce un papel importante en la protección y restauración del tejido nervioso en condiciones normales.

Cuando la homeostasis de SNC es alterada por un proceso patológico, como por ejemplo, la isquemia cerebral, las células microgliales alteran su expresión morfológica, y aumentan su cantidad notablemente en el sitio de la lesión. Este proceso de activación microglial es conocido como microgliosis (Davalos y col., 2005; Nimmerjahn y col., 2005; Wake y col., 2009). En nuestro modelo de desvascularización cortical ocurre el proceso de gliosis (Fig. 24) y microgliosis en el hemisferio lesionado, dicho fenómeno puede contribuir a la disminución del volumen de la lesión, mediante la formación de una cicatriz glial.

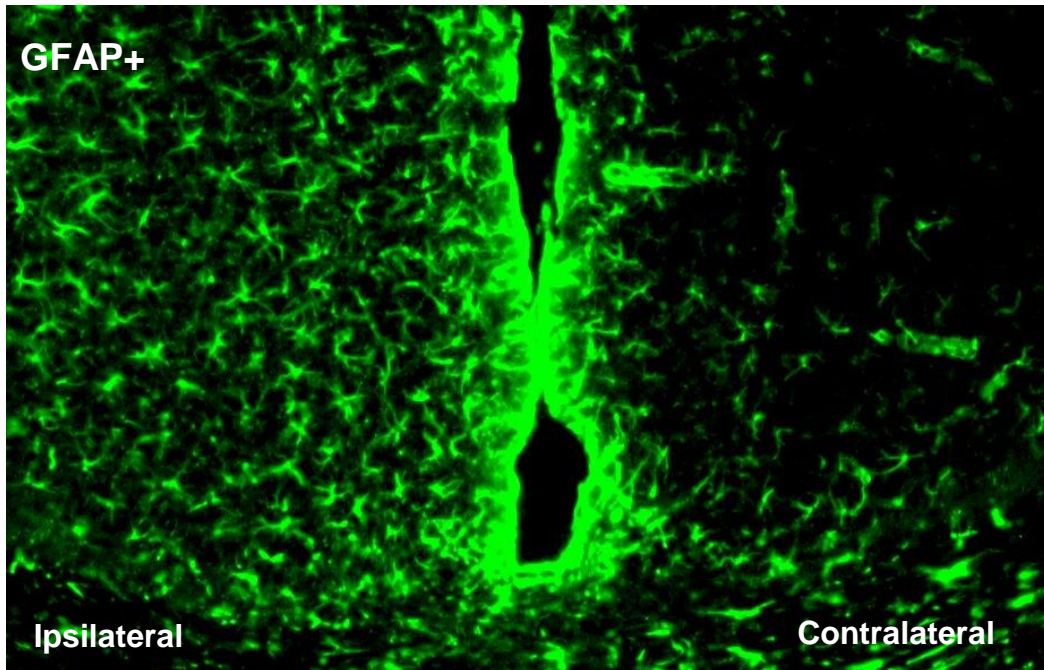


Figura 24. Gliosis a consecuencia de la desvascularización cortical. Inmunofluorescencia de GFAP en corte coronal de cerebro lesionado por desvascularización cortical. Resultado de estudios preliminares de DC, Laboratorio de Patología Celular y Molecular.

6.4.2 Proliferación celular

La segunda observación importante encontrada en la corteza lesionada fue la presencia de una gran cantidad de células en proliferación (BrdU+) en zonas adyacentes a la lesión (Fig. 15). Nuevamente se crea la interrogante de qué tipo celular está proliferando en la zona de daño, ¿Es una respuesta local? o ¿son células nuevas que migraron desde las zonas neurogénicas hacia el sitio de la lesión?

Es bien sabido la presencia de un proceso de microgliosis en la zona de daño, estudios previos han reportado que la microglía residente en el cerebro pasa por un proceso de activación y proliferación posterior a una isquemia cerebral (Ponomarev

y col., 2005; Bianco y col., 2006; Denes y col., 2007; Li y col., 2013), por esta razón, es posible que la proliferación encontrada en la corteza lesionada, sea producto en parte de células microgliales en proliferación, y de ser así, correspondería a una respuesta local.

6.4.3 Nuevos neuroblastos en corteza lesionada

Al realizar la caracterización fenotípica de las células en proliferación, nos encontramos con que existen células BrdU⁺ en la corteza que coexpresan con el marcador DCX (Fig. 22). Esto nos dice que existen nuevos neuroblastos que posiblemente migraron desde las zonas neurogénicas hasta la zona de lesión intentando regenerarla.

El proceso de migración de neuroblatos hasta la zona de lesión es posible, ya que se conoce que la quimiocina derivada de células estromales SDF-1, también conocida como CXCL12, es una quimiocina inducible que regula varios procesos fisiológicos y patológicos en el SNC a través de la interacción con los receptores de quimiocina CXCR4. Amplia evidencia apoya la idea de que la señalización mediada por SDF-1/CXCR4 desempeña un papel importante después de la isquemia cerebral, tanto en la dirección de la migración de neuroblastos a la zona de lesión, como en el aumento de la neovascularización del tejido dañado (Li y Ransohoff, 2008).

Li y colaboradores en el 2008 realizaron un modelo murino de isquemia focal y estudiaron la proliferación celular mediante la administración de BrdU. Aunado a esto los investigadores estimularon con SDF-1 para estudiar la posible migración de neuroblastos a la zona isquémica. Ellos demuestran la presencia de neuroblastos

mediante el doble marcaje de células BrdU⁺/ DCX⁺ en la corteza ipsilateral a los catorce (14) días post-lesión. De igual manera realizaron el doble marcaje de DCX con CXCR4. Las células que coexpresan ambos marcadores sugieren que la migración de nuevos neuroblastos fue producto la señalización de SDF-1 (Li y col., 2008)

El conjunto de resultados expuestos en este trabajo son evidencia de la importancia del proceso de neurogénesis en el cerebro adulto, especialmente en condiciones patológicas. Si bien esta respuesta neurogénica es insuficiente para restaurar la función neural en su totalidad, su estudio abre una ventana de posibilidades que permite ampliar conocimientos acerca de su regulación y potencialmente contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a mejorar la regeneración del SNC.

7. CONCLUSIONES

- El modelo experimental de isquemia focal por DC simula procesos característicos del ACV que permiten evaluar la respuesta adaptativa del proceso de la neurogénesis.
- La isquemia focal por DC induce un incremento de la neurogénesis en las regiones típicas y no típicas en un curso temporal característico. Este fenómeno sugiere una modulación diferencial para cada región.
- La caracterización fenotípica de las células en proliferación indica la generación de nuevas neuronas que podrían potencialmente incorporarse a circuitos neuronales funcionales.
- La DC es una lesión transitoria que demuestra una respuesta plástica de los elementos celulares que conforman la arquitectura de la corteza cerebral. Esta respuesta se evidencia con la disminución del volumen de lesión cortical al día 10 post-lesión.
- Se demuestra la presencia de neuroblastos en la corteza lesionada, lo que sugiere su posible migración desde las zonas neurogénicas hacia la zona de daño o la presencia de progenitores neurales latentes en la corteza cerebral.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Coll, D., & Sande, M. L. 2004. Biología molecular de la célula. Omega.
- Altman, J., & Das, G. D. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J comp neurol.* **124**, 319–335.
- Alvarez-Buylla A., García-Verdugo J.M. 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci.* **22** (3): 629-634.
- Alvarez-Buylla A., Lim D. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron.* **41**: 683-686.
- Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J. M., Tramontin, A. D. 2001. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Neuroscience.* 287-293.
- Ceulemas, A., Zgavc, T., Kooijman, R., Sarre, S. 2010. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. *J neuroinflam.* **7**(74).
- Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A., Deleo, A., Pastrana, E., Doetsch, F., 2014. Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron* **82**, 545–559.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D., Dustin, M., 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* **8**:752–758.
- Denes, A., Vidyasagar, R., Feng, J., Narvainen, J., McColl, B., Kauppinen, R., Allan, S., 2007. Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* **27**(12):1941-53.
- Doetsch F., 2003. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci.* **6**(11):1127-34
- Donnan, G., Fisher, M., Macleod, M., Davis, S., 2008. Stroke. *Lancet.* **371**, 1612–1623.

- Durukan, A., Tatlisumak, T., 2007. Acute ischemic stroke: overview of mayor experimental rodent models pathophysiology and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Be.* **87** (1): 179-197.
- Ekdahl, C.T., 2012. Microglial activation tuning and pruning adult neurogenesis. *Front. Pharmacol.* **3**, 41.
- Eklöf B., Siesjö B.1972. The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and the energy state of the rat brain. *Acta Physiol Scand.* **86**(2):155-65.
- Elliott, P. J., Garofalo, L., & Cuello, a C., 1989. Limited neocortical devascularizing lesions causing deficits in memory retention and choline acetyltransferase activity--effects of the monosialoganglioside GM1. *Neuroscience*, **31**(1), 63–76.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, a M., Nordborg, C., Peterson, D. a, & Gage, F. H. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med.* **4**(11), 1313–1317.
- Fernández-Klett, F., Priller, J., 2014. The fibrotic scar in neurological disorders. *Brain Pathol.* **24**(4):404-13.
- Fuentealba, L., Obernier, K., Alvarez-Buylla, A., 2012. Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell* **10**, 698–708.
- Ginsberg, M. D. 2008. Neuroprotection for ischemic. stroke: past, present and future. *Neurofarmacology.* **55**(3): 363-389.
- Goldman, S. 2005. Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system. *Nature Biotec.* **23**(7), 862–871.
- Gross, R., Mehler, M., Mabie, P., Zang, Z., Santschi, L., Kessler, J., 1996. Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* **17**, 595–606.
- Herrera, D. G., A.C. Cuello. 1992. Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity following cortical desvascularizing lesion. *Neuroscience.* **49** 781-791.
- Hossman, K. A. 2006. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell mol neurobiol.* **26**.

- Hossmann, K. 2012. The two pathophysiologies of focal brain ischemia: implications for translational stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab.* **32**(7):1310-6
- Jessell T.M., Sanes J.R. 2001. The induction and patterning of the nervous system. En: Kandel R.E. Schwartz J.H., Jessell T.M. (Ed.). Principles of Neural Science. Fourth Edición. MacGrawHill, USA. Pp. 1020-1036.
- Jin, K., Minami, M., Lan, J., Mao, X., Batteur, S., Simon, R., Greenberg, D. 2001. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci.* **98**(8):4710-5.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. 2001.principles of neural science. Third edition. Elsevier. NY, USA.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. 2004.principles of neural science. fourth edition. Elsevier. NY, USA.
- Kaplan, M., Hinds, J., 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* **197**, 1092–1094.
- Kempermann G., 2011. The pessimist's and optimist's views of adult neurogenesis. *Cell.* **145**(7):1009-11.
- Kempermann G., 2015. Adult Neurogenesis: An Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*
- Kernie, S. G., & Parent, J. M. 2010. Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis*, **37**(2), 267–274.
- Kokovay, E., Shen, Q., & Temple, S. 2008. The Incredible Elastic Brain: How Neural Stem Cells Expand Our Minds. *Neuron*, **60**(3), 420–429.
- Kokovay, E., Wang, Y., Kusek, G., Wurster, R., Lederman, P., Lowry, N., Shen, Q., Temple, S., 2012. VCAM1 is essential to maintain the structure of the SVZ niche and acts as an environmental sensor to regulate SVZ lineage progression. *Cell Stem Cell* **11**, 220–230.
- Lakhan, S. E., Kirchgessner, A., Hofer, M. 2009. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J transla med.* **7**: 97.

- Lee, J., Hong, J., Lee, P., Ahn, Y., Bang, O. 2010. A long term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *cell stem cell*. **28**(6).
- Li G., Kataoka H., Coughlin S.R., Pleasure S.J. 2009. Identification of a transient subpial neurogenic zone in the developing dentate gyrus and its regulation by Cxcl 12 and reelin signaling. *Development*. **136**: 327-35.
- Li, W., Yu, S., Ogle, M., Ding, X., Wei, L., 2008. Enhanced neurogenesis and cell migration following focal ischemia and peripheral stimulation in mice. *Dev Neurobiol*. **68**(13):1474-86.
- Lim, D., Tramontin, A., Trevejo, J., Herrera, D., García-Verdugo, J., Alvarez-Buylla, A., 2000. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* **28**, 713–726.
- Lin, R., Lacovitt, L. 2015. Classic and novel stem cell niches in brain homeostasis and repair. *Brain research*. 327-342.
- Liu, K., Wang, Z., Wang, H., Zhang, Y., 2002. Nestin expression and proliferation of ependymal cells in adult rat spinal cord after injury. *Chin. Med. J.* **115**, 339–341.
- Luskin M., Parnavelas J., Barfield J., 1993. Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat cerebral cortex originate from separate progenitor cells: an ultrastructural analysis of clonally related cells. *J Neurosci*. **13**(4):1730-50.
- Mhairi, M. 1992. New models of focal cerebral ischemia. *Brit j clin pharmaco*. **34** (4): 302-308.
- Miller, F. D., & Gauthier-Fisher, A. 2009. Home at Last: Neural Stem Cell Niches Defined. *Cell Stem Cell*, **4**(6), 507–510.
- Mohapel, P., Leanza, G., Kokaia, M. and Lindvall, O. 2005. Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning. *Neurobiol. Aging* **26**, 939-946.
- Molina-Holgado, E., Molina-Holgado, F., 2010. Mending the broken brain: neuroimmune interactions in neurogenesis. *J Neurochem*. **114**(5):1277-90

- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F., 2005 Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* **308**:1314–1318.
- Paez-Gonzalez, P., Asrican, B., Rodriguez, E., Kuo, C., 2014. Identification of distinct ChAT⁺ neurons and activity-dependent control of postnatal SVZ neurogenesis. *Nat Neurosci.* **17**(7):934-42.
- Ponomarev, E., Shriver, L., Maresz, K., Dittel, B., 2005. Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J. Neurosci. Res.* **81**, 374–389.
- Pulsinelli W., Brierley J., 1979. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*.10 (3):267-72.
- Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick D., Hall W. C., Lamantia A., McNamara J. O, Williams S. M. 2010. Desarrollo encefálico en la fase temprana. En: Neurociencia.Panamericana, España. Pp.553-564.
- Ramon Y Cajal S. 1952. Structure and connections of neurons. *Bull Los Angel Neuro Soc.* **17**(1-2):5-46.
- Russo, I., Barlati, S., Bosetti, F., 2011. Effects of neuroinflammation on the regenerative capacity of brain stem cells. *J. Neurochem.* **116**, 947–956,
- Shinozuka, K., Doiley, T., Tairi,N. 2013. Stem cell for neurovascular in stroke. *J stem cell.* **4**(4).
- Sierra, A., Encinas, J., Deudero, J., Chancey, J., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L., Tsirka, S., Maletic-Savatic, M., 2010. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* **7**, 483–495.
- Sofroniew, M. V, Pearson, R. C., Eckenstein, F., Cuello, a C., & Powell, T. P. 1983. Retrograde changes in cholinergic neurons in the basal forebrain of the rat following cortical damage. *Brain Research*, **289**(1-2), 370–374.

- Spiegler, M., Villapol, S., Biran, V., Goyenvalle, C., Mariani, J., Renolleau, S., Charriaut-Marlangue, C., 2007. Bilateral changes after neonatal ischemia in the P7 rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* **66**(6):481-90.
- Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D`Amau, K. A., Gage, F. H. 2007. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of sox2 neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell.* **1**(5): 515-528.
- Van Kampen, J. and Eckman, C., 2010. Agonist-induced restoration of hippocampal neurogenesis and cognitive improvement in a model of cholinergic denervation. *Neuropharmacology* **58**, 921-929.