

Tesis Doctoral

Análisis de modificaciones astrogliales reactivas en modelos experimentales de lesión mecánica in vitro e in vivo

Lanosa, Ximena Alejandra

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lanosa, Ximena Alejandra. (2011). Análisis de modificaciones astrogliales reactivas en modelos experimentales de lesión mecánica in vitro e in vivo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Lanosa, Ximena Alejandra. "Análisis de modificaciones astrogliales reactivas en modelos experimentales de lesión mecánica in vitro e in vivo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de ciencias exactas y naturales

**“ANÁLISIS DE MODIFICACIONES ASTROGLIALES REACTIVAS
EN MODELOS EXPERIMENTALES DE LESIÓN MECÁNICA *IN
VITRO E IN VIVO*”**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Ximena Alejandra Lanosa

Director de tesis: Dr. Jorge A. Colombo
Consejero de Estudios: Dra. Lilia Lauría De Cidre

Lugar de trabajo: **Unidad de Neurobiología Aplicada (CEMIC-CONICET).**

Buenos Aires, 2011.

“ANÁLISIS DE MODIFICACIONES ASTROGLIALES REACTIVAS EN MODELOS EXPERIMENTALES DE LESIÓN MECÁNICA *IN VITRO* E *IN VIVO*”

El proyecto de tesis analiza las modificaciones de la respuesta astrogliar postlesional, en modelos *in vitro* e *in vivo*.

El *Capítulo I* describe el estudio de la **respuesta astrogliar a la lesión en modelos *in vitro*** a fin de evaluar su modulación por las condiciones de cultivo. Tal respuesta, dependería de la interrupción de la *inhibición por contacto celular*, y no por señales mitogénicas astrogliales liberadas en el sitio de la herida.

El *Capítulo II* contempla el análisis de los **efectos postlesionales a distancia sobre el gliopilo luego de una lesión cortical en monos *Cebus apella***. La lesión cortical focalizada dio lugar a una respuesta de incorporación nuclear de BrdU predominante en láminas supragranulares de áreas corticales distantes y relacionadas funcionalmente con el área lesionada. El tipo celular involucrado en dicha respuesta a distancia no se logró especificar con los marcadores celulares analizados, por lo que serían necesarios estudios adicionales.

El *Capítulo III* expone el análisis de la modulación de la reactividad astrogliar postlesional por **exposición a una condición de Enriquecimiento Ambiental (EA), en ratas *Sprague-Dawley***. La exposición de los animales a EA en la etapa de desarrollo postnatal previa a la lesión, disminuyó la astrogliosis reactiva postlesional sugiriendo el impacto favorable de esta condición sobre los procesos de reorganización cortical postlesional. El aumento de la inmunomarcación de ezrina cortical de las ratas expuestas a EA, pudo haber sido impulsado por la formación de nuevas sinapsis, o el refuerzo de la participación astrogliar en las sinapsis existentes. La lesión interfirió con este efecto cuando ambos tratamientos se aplicaron juntos en el grupo experimental.

Palabras clave: Lesión astrogliar *in vitro*; Bromodeoxiuridina; Lesión cortical *in vivo*; Reactividad glial; Enriquecimiento ambiental

“ANALISIS OF REACTIVE ASTROGLIAL MODIFICATIONS IN EXPERIMENTAL MODELS OF *IN VITRO* AND *IN VIVO* MECHANICAL INJURY ”

The thesis project focused on analyzing changes on astroglial postlesional response in *in vitro* and *in vivo* models.

Chapter I describes the study of **astroglial response to injury in *in vitro* models**, to assess its modulation by culture conditions. Such *in vitro* response would depend on the *disruption of cell contact inhibition*, but not on astroglial mitogenic signals released into the wound site.

Chapter II provides an analysis of the **postlesional effects on the gliopilo at remote sites after a cortical injury in *Cebus apella* monkeys**. Focal cortical lesions resulted in a BrdU nuclear incorporation response predominantly in supragranular layers of cortical areas distant and functionally related to the injured area. Specification of the cellular type involved in this remote response was not achieved with the cellular markers analyzed, so further studies are needed.

Chapter III presents the analysis of the **astroglial postlesional reactivity modulation by exposure to an Environmental Enrichment (EE) condition, in *Sprague-Dawley* rats**. The exposure of animals to EE during postnatal development and previous to the lesion, decreased postlesional reactive astrogliosis suggesting the favorable impact of this condition on the postlesional cortical reorganization. Increased cortical ezrin immunostaining in rats exposed to EE could have been driven by the formation of new synapses or the reinforcement of astroglial involvement in the existing ones. The injury interfered with this effect when both treatments were applied together in the experimental group.

Keywords: *In vitro* astroglial injury; Bromodeoxyuridine; *In vivo* cortical injury; Glial reactivity; Environmental enrichment

CONTENIDOS

<i>Agradecimientos</i>	7
<i>Subsidios</i>	10
<i>Dedicatoria</i>	11
<i>Introducción General</i>	12
<i>Objetivos de la investigación</i>	17

—CAPÍTULO I—

Análisis de la respuesta proliferativa astrogliar en modelos de lesión in vitro y evaluación de su modulación

Introducción.....	21
Metodología	
Obtención de los cultivos celulares.....	22
Procedimiento de lesión mecánica e incubación con bromodeoxiuridina (BrdU).....	23
Condiciones para evaluar la modulación de la respuesta.....	24
Inmunocitoquímica.....	26
Análisis funcional del nivel de acoplamiento celular.....	28
Cuantificación de núcleos BrdU-IR.....	29
Análisis estadístico.....	30
Resultados	
1. Cultivos enriquecidos en astrogliar	
Efecto de las condiciones de confluencia del cultivo enriquecido en astrogliar sobre la respuesta postlesional.....	31
Efecto del tamaño de la herida en la respuesta postlesional.....	32
Dependencia de la respuesta postlesional al suero.....	32
Respuesta postlesional en cultivos de distintas regiones cerebrales.....	35
Evaluación de la posible existencia de factores postlesionales difusibles.....	36
Efecto de la lesión en el estado de acoplamiento astrogliar.....	38
Especificidad celular de la respuesta.....	38
2. Cultivos primarios de composición celular mixta	
Respuesta de proliferación en el contexto de un cultivo primario	

de composición celular mixta.....	41
Efecto de la lesión en el estado de acoplamiento astrogial en el contexto de un cultivo primario de composición celular mixta.....	49
Discusión.....	52
Conclusiones.....	57

—CAPÍTULO II—

Análisis de la respuesta proliferativa, local y distante, luego de una lesión quirúrgica programada en la corteza cerebral de monos *Cebus apella* adultos

Introducción.....	60
Metodología	
Animales.....	61
Procedimientos quirúrgicos.....	61
Administración de bromodeoxiuridina (BrdU).....	63
Fijación del tejido.....	63
Inmunohistoquímica/inmunofluorescencia.....	63
Análisis de la marcación.....	65
Análisis estadístico.....	67
Resultados	
Distribución cortical de la respuesta de proliferación.....	68
Inmuno-caracterización de las células corticales proliferantes.....	82
Discusión.....	85
Conclusiones.....	94

—CAPÍTULO III—

Análisis de las modificaciones astrogiales postlesionales en la corteza cerebral de roedores y la posibilidad de su modulación por exposición previa a la condición de enriquecimiento ambiental

Introducción.....	97
Metodología	
Animales.....	99
Diseño experimental.....	99
Procedimientos quirúrgicos.....	100

Administración de bromodeoxiuridina (BrdU).....	101
Fijación del tejido. Obtención y selección de los cortes.....	102
Procedimientos de inmunofluorescencia.....	103
Análisis de la marcación.....	103
Análisis estadístico.....	107
Resultados	
1. Astroglía reactiva: GFAP	109
2. Astroglía reactiva II: Vimentina.....	114
3. Transportadores de glutamato astrogliales: EAAT1.....	120
4. Procesos astrogliales periféricos (<i>PAPs</i>) sinápticos: Ezrina.....	123
Discusión.....	129
Conclusiones.....	134
<i>Comentarios integradores de capítulos.....</i>	
Escenario I: Astroglía aislada.....	138
Escenario II: Astroglía en presencia de otras células.....	140
Escenario III: Impacto a distancia.....	142
Escenario IV: Efecto del ' <i>ambiente circundante</i> '	143
<i>Perspectiva futura.....</i>	146
<i>Apéndice: Publicaciones que surgieron de este trabajo de tesis.....</i>	147
<i>Bibliografía consultada.....</i>	148

AGRADECIMIENTOS



*Margot (Ximena), en Plaza Francia, Bs As. Argentina.
Foto: Daniela Ramondetta, año 2009.*

Quiero agradecer profunda y sinceramente a todas las personas que me acompañaron en este camino de aprendizajes, intercambios y esfuerzos.

En primer lugar, muy especialmente quiero agradecer a Mis Padres, por su amor y su apoyo incondicional frente a las dificultades con las que me he enfrentado a lo largo de este camino, necesario para mi desarrollo profesional, y que me enriqueció también en lo personal. Por enseñarme a no bajar la guardia, a mantenerme firme en el objetivo y a ayudarme a vivir inmersa en este sistema muchas veces egoísta.

A mi Hermano, por darme una mano en metodologías y conflictos con los sistemas computacionales –no soy ninguna experta–, y tenerme paciencia en ello. Muy meritorio de su parte.

A mi familia en general, por acompañarme siempre.

A mi Director, Dr. Jorge Colombo, por la experiencia que le transmitió a esta ‘Aprendiz de hechicera’. Por su paciencia y fortaleza, por su apoyo en los momentos donde el sistema me dio la espalda.

Muy especialmente a la Sra. Beatriz Stuto, por su apoyo en lo administrativo, y por sus felicitaciones en mis logros.

A mis compañeros del laboratorio –a todos ellos–, por la ayuda prestada en las tareas de laboratorio y en todo momento, más allá de los conflictos personales que hayan surgido alguna vez, que son inevitables y comunes a toda ‘convivencia’ cotidiana, aunque ella se trate en ámbito laboral. Muchas gracias. Especialmente quiero agradecer a la Sra. Cristina Juarez por su

desempeño y apoyo en las tareas técnicas del laboratorio necesarias para el desarrollo de esta Tesis.

A todos mis amigos cercanos y lejanos, conocidos y no tanto. Gracias por la comprensión respecto a mis tiempos, no siempre abiertos a ellos por estar metida en el trabajo, muchas veces absorbente que requiere una tesis doctoral, y las tareas de investigación en general. Muy especialmente a mi amiga-hermana Daniela Ramondetta por su ayuda en la impresión y encuadernación de esta Tesis.

A todos los profesionales –argentinos y extranjeros–, que en algún momento de este camino participaron en mi formación y ampliaron mis conocimientos.

Gracias a todos los artistas amigos, que me enseñaron a vivir inmersa en la magia del arte de la danza y del mimo. Logré un equilibrio entre ‘mi ciencia y mi arte’, y una retroalimentación entre ellos que los fue enriqueciendo mutuamente. En especial a mi maestro argentino del mimo Ángel Elizondo y a mi maestra bailarina muy querida Estela Erman.

Por último, quiero agradecer a cada uno de mis amigos-hermanos centro y latinoamericanos, del Curso Ricardo Miledi, que realicé en la ciudad de México el pasado año 2010. Ellos me mostraron visiones distintas de cómo hacer investigación científica en sus países de origen. Me acompañaron también en los últimos momentos de esta investigación. Los lazos que formamos, y su cariño y ejemplo me dieron fuerzas para transitar el último tramo de mi tesis. Esta experiencia marcó un hito en mi vida y me enriqueció muchísimo. Gracias chicos, ‘Mileditos’ (como nos llamamos).

Pero este camino no termina acá, en este punto.

Y me mantengo en movimiento... Lanosa, X.

SUBSIDIOS

Esta tesis doctoral fue realizada en parte con el apoyo de los subsidios **PIP 5106 (CONICET); PICT 14109 (FONCyT); PICT 0694 (FONCyT);** y de **Fundación Conectar.**

A los 'Mileditos'...



México, 2010.

INTRODUCCIÓN GENERAL

*'Hay dos cosas que son infinitas: el universo y la estupidez humana; de la primera no
estoy muy seguro'*

Albert Einstein (1879-1955)

La evidencia clínica y experimental señala que los procesos de neuroregeneración y reorganización en el sistema nervioso central de mamíferos adultos, son limitados. Puesto que los astrocitos muestran características específicas de región, su heterogeneidad podría reflejar diferencias funcionales en las interacciones celulares entre neuronas y células gliales (Wilkin y cols., 1990). Por lo tanto, en algunas condiciones, los astrocitos reactivos podrían representar un sustrato permisivo para el crecimiento axonal, y en otras, un sustrato no permisivo (Ridet y cols., 1997). Este fenómeno lleva a la supervivencia neuronal o a su muerte, a la regeneración axonal o a su degeneración (Bähr y Bonhoeffer, 1994). La existencia de un supuesto balance entre factores inductores y represores de los procesos de neurito- y sinaptogénesis, así como la discontinuidad estructural y funcional que representa la producción de una cicatriz en el parénquima nervioso, justifican el interés por profundizar el análisis de los procesos reactivos postlesionales en el sistema nervioso central de mamíferos y desarrollar posibles estrategias basadas en la modulación de los mismos.

En el marco de lo expuesto en el párrafo anterior, cabe mencionar que la gliosis reactiva es un fenómeno del SNC, común a diversos procesos neuropatológicos tales como isquemia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer o esclerosis múltiple, entre otros. Los procesos reactivos que ocurren como resultado de lesiones traumáticas o isquémicas en el cerebro, involucran varios tipos celulares y generalmente resultan en la eliminación del tejido dañado, en el aislamiento de las áreas intactas respecto de la zona de trauma y en la reorganización de circuitos nerviosos (Norenberg, 1994; Landis, 1994). El rol crucial de la astrogliá en la organización y mantenimiento del neuropilo del sistema nervioso central de los mamíferos, sugiere la necesidad de analizar su intervención en los procesos de reorganización subsiguientes a una lesión. Durante los mismos, ocurre una cascada de eventos químicos y estructurales a nivel local y en áreas distantes, vinculadas por proyecciones celulares o alimentadas por fuentes de vascularización común. Los

“astrocitos reactivos” se evidencian en la zona de tejido afectada por la pérdida de mielina y neuronas, y participan en la formación de una cicatriz compuesta de células y matriz extracelular (Lindsay, 1986). Sin embargo, aun no está claro si poblaciones de astrocitos locales ya diferenciados, o poblaciones de precursores gliales quiescentes, son los que dan origen a los astrocitos que integran la cicatriz, como tampoco está claro el origen y naturaleza de la(s) señal(es) involucrada(s). Entre otras características de los astrocitos reactivos, se observa hipertrofia del núcleo, cuerpo y procesos celulares; aumento de la expresión de GFAP y vimentina, proliferación y migración celular (Ridet y cols., 1997).

Asimismo, se ha demostrado que la reactividad astrogliar influye sobre la sinaptogénesis, y el número de terminales presinápticos. La proteína *ezrina* (parte de los procesos astrocíticos periféricos, PAPs) aumenta en astrocitos reactivos y está asociada con el aumento de la capacidad invasiva de tumores astrocíticos (Emirandetti y cols., 2006; Derouiche y cols., 2001). Dada su interacción con el citoesqueleto, esta proteína podría participar en cambios de forma y movilidad celular que ocurren en los astrocitos reactivos e influir en su participación en las sinapsis.

Dada la complejidad del neuropilo *in situ*, el análisis de los fenómenos reactivos en **modelos experimentales *in vitro*** permite la posibilidad de definir y controlar conjuntos de variables en juego y, por lo tanto, de generar un diseño experimental de complejidad creciente, así como el uso de ciertas metodologías (tal como la inyección intracelular) cuya aplicación resulta más difícil en una preparación *in vivo*. Para el estudio de los procesos de activación glial han sido propuestos varios modelos *in vitro* a partir de tejidos provenientes de roedores (Mc Millian y cols., 1994; Wu y Schwartz, 1998; Hou y cols., 1995; Yu y cols., 1993; Mukhin y cols., 1998). Como respuesta a la lesión mecánica por raspado, algunos signos típicos de la reactivación *in vivo* de células astrogliales fueron reconocidos en el área lesionada, tales como los mencionados en párrafos anteriores.

Otro aspecto interesante de la respuesta glial en roedores, es la presencia de astrocitos reactivos a una distancia considerable del sitio de lesión primario (Norenberg, 1994). Los citoplasmas de los astrocitos se encuentran comunicados estructural y funcionalmente por uniones *gap*, definiéndose un sincicio funcional de características dinámicas (Giaume y McCarthy, 1996). Se ha detectado que estas uniones *gap* podrían mediar la propagación del daño celular (Lin y cols., 1998), que conexina 43 –componente de tales uniones– se redistribuye en los astrocitos reactivos en respuesta a una lesión (Ochalski y cols., 1995), y que la “cicatriz no permisiva” contiene más uniones *gap* que la “cicatriz permisiva” (Ridet y cols., 1997), sugiriendo que ciertos procesos involucrados en la regeneración axonal subsiguiente a una lesión, podrían estar asociados a fenómenos vinculados con el grado de acoplamiento celular en la cicatriz glial. Es decir, que cabe la posibilidad de que la lesión de un cultivo confluyente de astrocitos pueda afectar no sólo a las células lesionadas directamente, sino a células más distantes al sitio de lesión, sea de manera indirecta por medio de moléculas ‘señal’ via uniones *gap* (Lin y cols., 1998), o bien a través de factores liberados al medio extracelular (Hassingier y cols., 1996).

Si bien los efectos locales de una lesión cortical en la astrogliá han sido estudiados por varios autores, la **repercusión de una lesión en sitios remotos** no ha sido caracterizada aún en primates. Un efecto “a distancia” podría depender de mecanismos estructurales y funcionales, tales como aquellos proporcionados por las fibras de asociación y de proyección neuronales, la dimensión real del “*sincitio panglial*” (Dermietzel y Spray, 1998) afectado por la lesión, y la distribución de territorios vasculares lesionados. El análisis de la posible repercusión astrogliá a distancia como parte de la fenomenología del daño cerebral, es un tema de interés en el campo de la neuropatología en humanos, y su estudio en primates podría contribuir a la comprensión de los procesos corticales de reorganización y recuperación, posteriores a una lesión en la corteza cerebral. En otras palabras, estas alteraciones de la red astrogliá a distancia cobran particular relevancia

para el *management* de pacientes con lesión cerebral –programada o no–, en la medida que podría actuar como modificadora del neuropilo en regiones distantes.

Por último, si se tiene en cuenta que los abordajes neurorehabilitatorios se basan fundamentalmente en el concepto de compensación, es decir en la reorganización de circuitos neurales sobrevivientes para desempeñar una función previamente atribuida a los circuitos dañados (Robertson y cols., 1999), cobra interés la posibilidad de que variables sensorio-motoras puedan modificar la respuesta astrogliol postlesional si son aplicadas en forma previa y/o posterior a la lesión. Avalan esta posibilidad, las experiencias obtenidas con primates en nuestro laboratorio (*U.N.A.*), en el bloqueo del efecto sobre el desempeño cognitivo del neurotóxico MPTP por exposición previa a entrenamiento cognitivo (Lipina y Colombo, 2007). Por ello se consideró de interés explorar el **impacto potencial “preventivo” del Enriquecimiento Ambiental (EA)** sobre algunos de los parámetros de la astrogliol reactiva subsiguiente a una lesión, en ratas de laboratorio. También avalan este análisis inicial, los efectos favorables del Enriquecimiento Ambiental (EA) sobre los procesos de reparación subsiguientes al daño cerebral, que han sido estudiados en modelos de roedores mediante la valuación de habilidades cognitivas (Will y cols., 1977; Johansson, 1996; Grossman y cols., 2003; Xerri y cols., 2003).

Si bien las investigaciones de regeneración/reparación se han centrado principalmente en el estudio de los efectos del EA postlesional sobre eventos de plasticidad neuronal (Johansson y Belichenko, 2002; Komitova y cols., 2002; Lipper-Gruener y cols., 2007; Weiloch y Nikolich, 2006), el EA como un posible factor preventivo en términos de la reactividad astrogliol no ha sido aún caracterizado, por lo que se incluyen estudios tendientes a evaluar esta posibilidad.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

'No creas nada por el simple hecho de que muchos lo crean o finjan que lo creen; créelo después de someterlo al dictamen de la razón y a la voz de la conciencia'

Siddhārtha Gauthama Buddha

El objetivo general de este proyecto de Tesis se centró en el análisis de la respuesta astrogliar subsiguiente al daño y de posibles variables modificadoras de dicha respuesta, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*. Para ello se planteó el análisis de variables que puedan afectar la respuesta astrogliar proliferativa subsiguiente a una lesión en un modelo *in vitro*, la caracterización *in vivo* de dicha respuesta en áreas remotas a la lesión en una especie de primate, y la posible modificación de la reactividad astrogliar por exposición a un ambiente enriquecido previamente a la inducción de una lesión cortical en roedores.

: Por una parte, el análisis experimental de los fenómenos reactivos plantea diversas posibilidades o limitaciones según se realice en condiciones *in vivo* o *in vitro*. Dada la complejidad del neuropilo *in situ*, el análisis de los fenómenos reactivos en modelos experimentales *in vitro* permite generar un diseño experimental para definir y controlar las variables en juego, y facilitar la aplicación de ciertas metodologías tales como la inyección intracelular. Los objetivos específicos que se plantearon en este sentido fueron:

(1) El estudio de la respuesta astrogliar en un modelo *in vitro* de cultivos celulares enriquecidos en astrogliar y evaluar la posibilidad de su modulación por las condiciones de cultivo para contribuir a la caracterización de posibles mecanismos involucrados en la respuesta de proliferación y en el estado de acoplamiento de este tipo celular, luego de una lesión. En tal sentido, se planteó analizar:

- i. La distribución espacial de la respuesta de proliferación astrogliar respecto a la distancia desde la lesión;
- ii. Esa respuesta, en función de la región cerebral (corteza cerebral, cuerpo estriado y mesencéfalo ventral);
- iii. La existencia de señales difusibles y/o vinculadas a uniones intercelulares de tipo "gap"; involucradas en dicha respuesta;

- iv. Las variables del medio de cultivo que podrían modular esta respuesta proliferativa postlesional;
- v. El efecto de la lesión en el estado de acoplamiento astrogial;
- vi. La respuesta de proliferación astrogial en el contexto de un cultivo primario de corteza cerebral de composición celular mixta, en lugar de enriquecido en astroglia.

Por otra parte, la proliferación glial reactiva local es uno de los fenómenos celulares que acompaña a los procesos de reorganización luego de una lesión en el sistema nervioso central (SNC). Si bien los efectos de una lesión sobre la astroglia local han sido estudiados, su posible repercusión en sitios corticales remotos no ha sido caracterizada profundamente aún y la importancia de su exploración en primates cobra aún mayor interés. En tal sentido, se planteó:

(2) El análisis de la respuesta proliferativa, local y distante, luego de una lesión quirúrgica programada en la corteza cerebral de monos *Cebus apella* adultos, y así contribuir a una mayor comprensión de la respuesta a la lesión en el SNC de primates.

Por último cabe mencionar que luego de un daño en el neuropilo, se define una situación de equilibrio dinámico dual, entre eventos astrogiales favorables y desfavorables para los procesos de regenerativos. Dado que la estrategia básica para favorecer la reparación funcional del SNC, podría ser la modificación de este equilibrio en favor de los procesos de regeneración del tejido, se propuso un tercer análisis:

(3) Los efectos astrogiales de una lesión en la corteza cerebral de roedores y la posibilidad de su modulación por exposición previa a la condición de Enriquecimiento Ambiental.

CAPÍTULO I

“ANÁLISIS DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA ASTROGLIAL EN MODELOS DE
LESIÓN *IN VITRO* Y EVALUACIÓN DE SU MODULACIÓN”

*‘Todo cabe en lo breve. Pequeño es el niño y encierra al hombre; estrecho es el cerebro y
cobija el pensamiento; no es el ojo más que un punto y abarca leguas’*

Alejandro Dumas (1803-1870)

INTRODUCCIÓN

Los modelos *in vitro* de sistemas de células se han propuesto para el estudio de la activación glial e interacciones celulares luego de una lesión (MC Millian y cols., 1994; Faber-Elman y cols., 1996; Wu y Schwartz, 1998). Al exponer cultivos confluentes enriquecidos en astrogliá a una lesión mecánica directa, fueron observados diversos signos reactivos en el área lesionada (Hou y cols., 1995; Mukhin y cols., 1998; Yu y cols., 1993), como ser la proliferación celular (Környei y cols., 2000). Sin embargo, varias cuestiones deben explorarse para poder convalidar tal modelo en el estudio de algunos de los fenómenos complejos que tienen lugar *in situ*, tras el daño del tejido cerebral.

Por lo tanto, este capítulo presenta resultados de un estudio que intenta contribuir al análisis de la hipótesis propuesta de que una discontinuidad experimentalmente inducida en un cultivo celular confluyente podría representar un modelo útil para el análisis de los procesos reactivos gliales involucrados en una lesión. A tal fin, se investigó si la proliferación celular representa un efecto íntimamente vinculado con una cascada de citoquinas suscitada por la lesión (Giulian y Lachman, 1985; Yong y cols., 1991; Hindley y cols., 1994; Norenberg, 1994; Oh y cols., 1993; Eclancher y cols., 1996; Faber-Elman y cols., 1996; Hodges-Savola y cols., 1996; Rathbone y cols., 1998; Franke y cols., 1999) o, en su lugar, representa un suceso relacionado con la *inhibición por contacto* del crecimiento celular. Para ello, la respuesta de proliferación por incorporación nuclear de *bromodeoxiuridina* (*BrdU*) fue analizada en varias condiciones tras la lesión de cultivos confluentes enriquecidos en astrogliá, así como su impacto sobre el estado de acoplamiento celular. Por otra parte, también se analizó la respuesta de proliferación astrogliá en el contexto de un cultivo primario de corteza cerebral de composición celular mixta.

METODOLOGÍA

Obtención de los cultivos celulares

Para la obtención de los cultivos celulares se utilizaron los procedimientos habituales en el laboratorio de la U.N.A. y de otros autores (McCarthy y DeVellis, 1980; Napp y Colombo, 2000; Colombo, 2005; Berninger y cols., 2007).

Los cultivos celulares primarios mixtos se obtuvieron de la corteza cerebral, cuerpo estriado y mesencéfalo ventral de ratas macho *Sprague-Dawley* de 5 dpn (días postnatales) de edad, mantenidas en bioterio bajo condiciones controladas, y ciclos de luz-oscuridad de 24hs. Se extrajeron los cerebros de los animales y durante la disección se aseguró el retiro completo de las meninges. La suspensión celular de cada área disecada fue obtenida por la disociación mecánica del tejido en una solución de PBS, glucosa 6% y gentamicina (100 µg/ml). Luego de la centrifugación y resuspensión, una parte se sembró y mantuvo como stock en frascos de cultivo, y otra parte en cubreobjetos de 1x1 cm, cubiertos previamente con poli-L-lisina, en una densidad de células de $\approx 10^4/\text{cm}^2$, con DMEM-F12, suplementado con SFB 10%, 50 µg/ml de gentamicina, en una atmósfera con humedad, temperatura y niveles de CO₂, controlados. Los cultivos primarios mixtos fueron caracterizados en su composición celular en el estado de confluencia utilizando anticuerpos específicos (ver sección *Inmunocitoquímica* más adelante). Para tal fin se sembraron muestras de cada cultivo en cubreobjetos distintos a los destinados a los ensayos de lesión. Cada anticuerpo específico se analizó por separado destinando 3 cubreobjetos para cada uno de ellos, considerando cada muestra como representativa del cultivo primario mixto. El conteo se realizó en 9 campos dentro de cada cubre, registrando las células inmunoreactivas para cada marcador respecto a las células totales por campo de conteo, expresando esta relación en porcentajes. Luego se promediaron los valores respectivos a cada marcador dentro de cada cubre y

posteriormente entre cubres, aplicando la regla de propagación de errores. Finalmente se expresaron los resultados en porcentajes relativos, como $\text{media} \pm \text{desvio estándar}$.

Los subcultivos enriquecidos en astrogía se obtuvieron de cultivos primarios mixtos por agitación -para desprendimiento de las células no astrogiales- y por resembrados sucesivos (3 repiques). Asimismo se utilizaron cultivos enriquecidos en astrogía crioadmacenados en nitrógeno líquido.

Los cultivos de fibroblastos se obtuvieron de leptomeninges o por raspado de la dermis, seguido de siembra directa en los frascos de cultivo, bajo las mismas condiciones estándar.

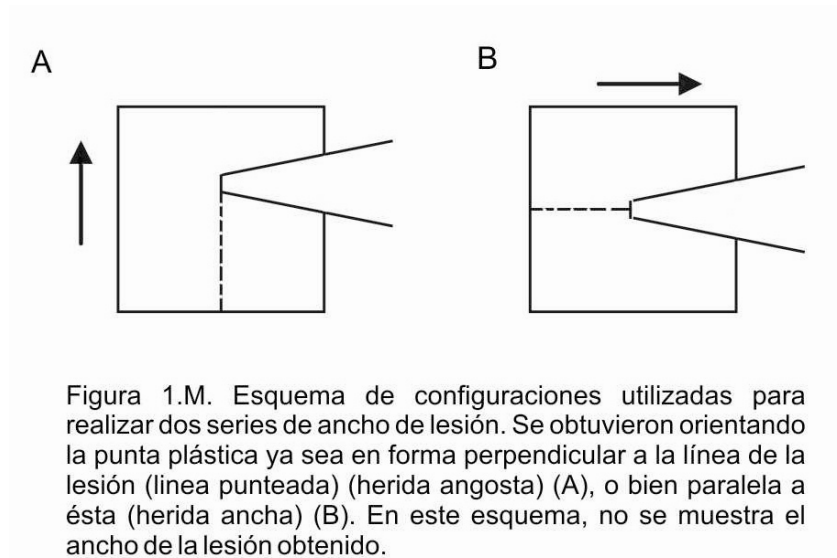
Una vez alcanzada la confluencia, los cultivos enriquecidos –en astrogía o en fibroblastos- se disociaron con tripsina 0,05% y se resembraron en cubreobjetos como se describió anteriormente.

El enriquecimiento en astrogía o fibroblastos consistió en la obtención de un porcentaje mayor a 90 % de Células GFAP+ o fibronectina+, respectivamente.

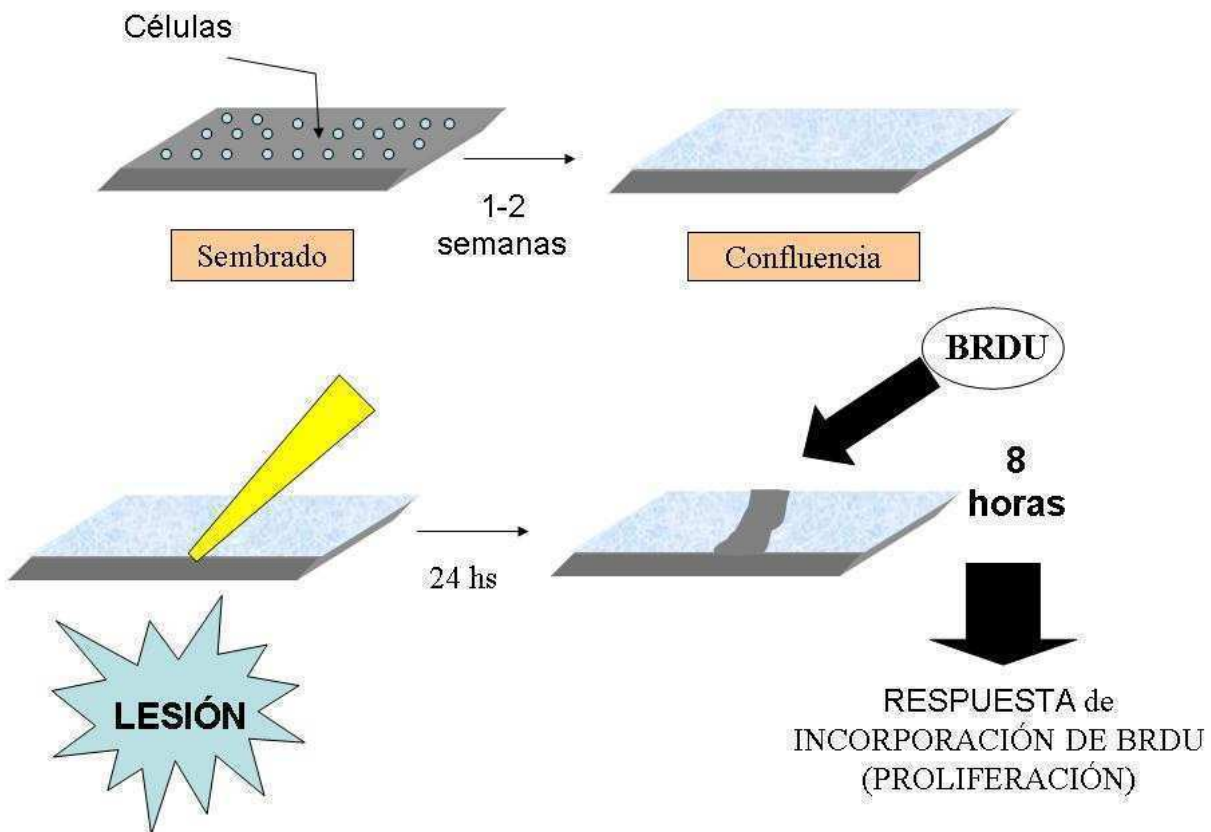
En todos los casos, la viabilidad de la células se confirmó con el ensayo de exclusión usando *Trypan blue*.

Procedimiento de lesión mecánica e incubación con bromodeoxiuridina (BrdU)

Las lesiones mecánicas de los cultivos confluentes se basaron en el procedimiento *in vitro* de “scratch-wound”, desarrollado por Yu y cols. (1993). Para este propósito, los cultivos celulares confluentes fueron raspados en su centro usando una punta plástica estéril, para producir una sola herida lineal. Se analizó el efecto del ancho de la herida, realizada según las configuraciones que se muestran en la figura 1.M. Dos diferentes anchos de herida se obtuvieron orientando la punta plástica ya sea en forma perpendicular a la línea de la lesión, o paralela a ésta (herida angosta y ancha, respectivamente). Cultivos no lesionados se utilizaron como control de esta condición.



Los cultivos se incubaron por un período de 8 horas con Bromodeoxiuridina (BrdU) 600 ng/ml (análogo de la timidina que es incorporada al ADN de células en fase S del ciclo celular, y se utiliza como indicador de proliferación celular), a partir de las 24 hs. después de la lesión, es decir, cuando es máxima la respuesta proliferativa postlesional (Yu y cols., 1993; Hou y cols., 1995; Környei y cols., 2000) (Esquema 1).



Esquema 1.

Condiciones para evaluar la modulación de la respuesta

1. *Tiempo transcurrido después de alcanzada la confluencia celular.* Para este propósito, los ensayos de lesión fueron realizados inmediatamente luego de alcanzada la confluencia celular (confluencia reciente), o una semana después (confluencia tardía).
2. *Suero-dependencia de la respuesta.* Se evaluó bajo dos condiciones: por privación de suero o por su sustitución. Para este propósito, el medio de cultivo DMEM/F-12 se utilizó sin SFB o éste fue sustituido con SITE 1x (Sigma), inmediatamente antes de la lesión.
3. *Perturbación del medio de cultivo Postlesional.* Se investigó la existencia de una posible señal difusible extracelular liberada al medio de cultivo desde el sitio de la lesión, capaz de inducir la respuesta de proliferación astrogliar. Para ello, los cultivos confluentes fueron lesionados y expuestos a sesiones de “turbulencia” en el medio (“T”; 3 pipeteos repetidos

del medio de cultivo para evitar la formación de posibles microgradientes de moléculas señal), o de reemplazo del medio de cultivo ("L"; 3 lavados por sesión) a distintos tiempos: inmediatamente después de lesión, seguida por otra a los 15 minutos, y en intervalos sucesivos de una hora, durante un período de 4 horas (postlesional). Fueron incluidos controles (Fig. 2.M).

4. *Bloqueo de uniones "Gap"*. Para el bloqueo los cultivos se incubaron con carbenoxolona (Cbx) (100 μ M, Sigma). Debido a la alta afinidad de Cbx a la albúmina, en estos experimentos el suero se eliminó durante el período de incubación. En pruebas preliminares de tolerancia/toxicidad celular a Cbx 100 μ M, se evidenciaron bajo microscopio de fase, detritus y vacuolizaciones celulares después de 2 horas de incubación. Por ende, el tratamiento con Cbx se aplicó entonces 5 minutos antes de lesión y sólo se mantuvo durante la primera hora del experimento. Los siguientes grupos control fueron incluidos: cultivos no lesionados con y sin el tratamiento de Cbx; cultivos lesionados con y sin lavados (para eliminar Cbx, después de la incubación se realizaron tres lavados). Después de tal período, el suero fue restituido y las células se mantuvieron en condiciones estándares de cultivo durante la noche, hasta la adición de BrdU (Fig. 3.M).

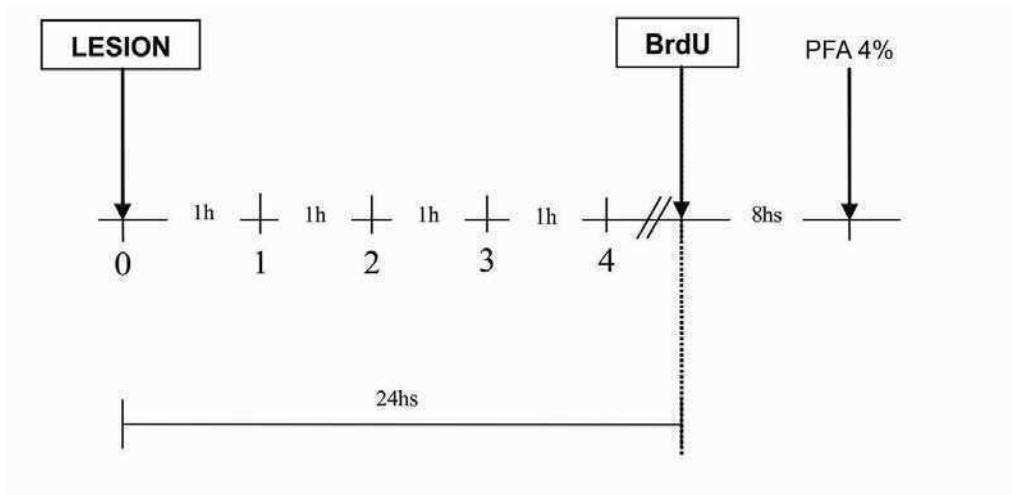


Figura 2.M. Protocolo de aplicación de "turbulencia" o reemplazo (lavados) del medio de cultivo postlesional. Puntos 0-4: puntos de aplicación del tratamiento correspondiente. PFA: paraformaldehído.

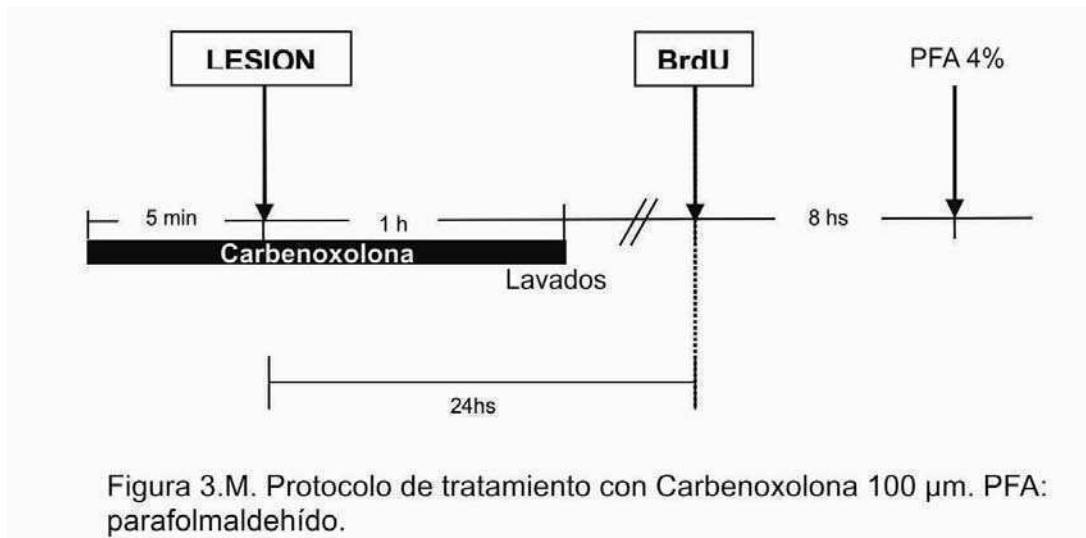


Figura 3.M. Protocolo de tratamiento con Carbenoxolona 100 µm. PFA: paraformaldehído.

Inmunocitoquímica

Luego de la incubación con BrdU, los cultivos se fijaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, con paraformaldehído 4% y posteriormente se lavaron con PBS. Se permeabilizaron las membranas celulares con Triton X-100 (5 min. 0,25% v/v en PBS). Para la inmunomarcación de BrdU nuclear, se desnaturalizó el ADN con HCl 1N a 37 ° C durante 1h. La marcación inespecífica se bloqueó con BSA al 5% en PBS a 37 ° C durante 1h. Se incubó con el anticuerpo anti-BrdU (1/250 en BSA al 0,5%; monoclonal, ratón, Sigma.) a 4 ° C durante la noche. Se incubó con el anticuerpo secundario

conjugado con biotina (1/200 de ratón anti-IgG, Sigma) a temperatura ambiente 30 min. Se incubó con extravidina-peroxidasa (1/200, Sigma) a temperatura ambiente 30 min y posteriormente se reveló con DAB (Sigma). Para evaluar la coincidencia entre BrdU y un indicador endógeno de células en ciclo/ proliferación, se reveló el BrdU con anticuerpo conjugado con AlexaFluor 488 (1/400, Invitrogen) y se utilizó un anticuerpo anti-Ki-67 (policlonal de conejo, 1/100; Millipore), posteriormente revelado con anti-IgG de conejo conjugado con Alexa fluor 635 (1/200; Invitrogen).

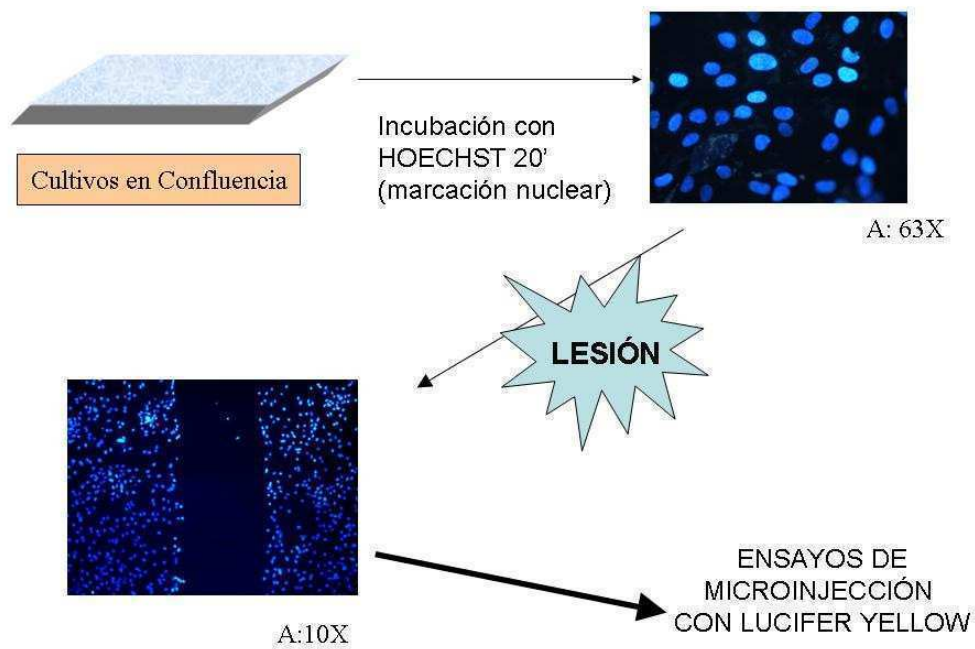
La composición celular de los cultivos primarios mixtos se evaluó mediante inmunomarcación para astroglia (anti-GFAP 1/500; Biogenex); microglia (CD11b 1/500, Santa Cruz bt); neuronas (anti-NeuN, 1/100, Chemicon) y oligodendrocitos (anti-MBP 1/100, Chemicon). Para ello, se utilizó el procedimiento descrito anteriormente, con exclusión de la incubación con HCl. Se utilizaron los anticuerpos secundarios biotinilados, anti-IgG (1/100, Sigma) y anti-IgM (1/100, Sigma). Se realizó una coloración de contraste con hematoxilina. Se caracterizaron los subcultivos enriquecidos en astroglia y se utilizaron aquellos que presentaron una marcación >90% para GFAP. Un anticuerpo anti-Fibronectina (1/200; Sigma) se utilizó para caracterizar los cultivos de fibroblastos (Fibronectina+, GFAP-).

Con el fin de identificar las células con núcleo BrdU-IR en los cultivos primarios mixtos, se realizaron inmunomarcaciones dobles, con anti-GFAP (policlonal de conejo, 1/100, Sigma), seguido de anti-IgG biotinilado de conejo (Sigma, 1/200) y se reveló con peroxidasa-DAB-Ni; y la marcación de microglia, con IB4 (conjugada con biotina, 1/100, Vector Laboratories), seguido por estreptavidina conjugada con Cy3 (1/200, Jackson Immunoresearch). Se utilizó el procedimiento descrito anteriormente, con exclusión de la incubación con HCl. Para los estudios de correlación en los cultivos primarios mixtos, se realizaron marcaciones triples con GFAP-BRDU-IB4.

Análisis funcional del nivel de acoplamiento celular

En cultivos de la corteza cerebral, se utilizaron procedimientos de microinyección intracelular (*dye-coupling*) para evaluar si el acoplamiento astrogial se modificaba luego de una lesión mecánica. Previo a este procedimiento, los núcleos celulares se identificaron por tinción de Hoechst (20 µg/ml) y se realizó una lesión lineal como la descrita anteriormente. Luego, se aplicaron los procedimientos de microinyección utilizando *Lucifer Yellow* (LY) (457,3 Da) preparado en una solución tampón intracelular (Gayol y cols., 1999), inyectado usando un inyector a presión conectado a un micromanipulador, y visualizado con un microscopio óptico equipado con epifluorescencia. Se analizó la difusión de LY desde la célula inyectada hacia células vecinas acopladas ("*dye-coupling*"). Se capturaron las imágenes con una cámara CCD. El acoplamiento astrogial fue analizado dentro de los 200 µm y los 1000 µm de distancia a la herida, en 1 y 24 horas después de lesión. Los cultivos intactos se analizaron para establecer el nivel de acoplamiento basal (Esquema 2). Dos aspectos principales fueron evaluados:

- i) Porcentaje de células acopladas respecto al total de intentos (*% de acoplamiento celular*);
- ii) Análisis de frecuencias del número de las células marcadas con LY por cada célula inyectada (*nube de células acopladas*).



Esquema 2.

Cuantificación de núcleos BrdU-IR

La observación de los preparados se realizó bajo microscopios ópticos de campo claro y equipado con epifluorescencia (Leica DM-LFS y Zeiss Axiovert, respectivamente) y las imágenes se capturaron con cámara CCD. El nivel de proliferación en función de la distancia a lesión, se determinó contando el número de núcleos BrdU-IR /mm² en el área total cubierta por las células, en diez franjas contiguas de 200 µm de ancho, empezando en los bordes de la herida, hacia ambos lados. En el caso de los controles intactos, el conteo se realizó por el mismo procedimiento pero desde una marca central lineal de referencia, hecha en el cubreobjetos. En cultivos lesionados, los niveles reactivos de núcleos BrdU-IR /mm² en la franja 1 (*nivel de respuesta postlesional*) se expresaron como porcentaje relativo al nivel promedio hallado en las franjas periféricas, según la siguiente fórmula: $[(\text{franja } 1 - \text{periferia})/\text{periferia}] \times 100$, y se calcularon promedios entre los cubreobjetos. En forma equivalente, se analizaron los cultivos intactos.

La coincidencia entre las marcaciones BrdU y Ki-67 en la franja 1 (cercana a la lesión), se evaluó en 16 campos por cada cubreobjetos, de un total de 4 cubreobjetos pertenecientes a un cultivo lesionado representativo. Las imágenes de ambas marcaciones fueron observadas al microscopio de epifluorescencia con los filtros correspondientes y capturadas con una cámara CCD. Para cuantificar manualmente la cantidad de núcleos en cada imagen correspondiente a cada marcador, se utilizó el programa ImageJ (versión 1.43u). La cuantificación de los núcleos doblemente marcados se realizó sobre imágenes superpuestas (*merge*) de cada marcador. El resultado se expresó como porcentaje de núcleos doblemente marcados relativo al total de núcleos BrdU-IR, y se calculó un promedio entre los 4 cubreobjetos.

Análisis estadístico

Se realizó con la colaboración del Llc. Fernando Poletta, especialista en estadística del instituto ECLAM del CEMIC. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS (versión 12.0) y el STATA (versión 8.0). La distribución normal de variables fue evaluada con el Test de Kolmogorov-Smirnov. La distribución de la variable núcleos BrdU-IR /mm² fue normalizada aplicando la raíz cuadrada. La homocedasticidad fue evaluada con el Test de Levene. Los efectos entre los casos fueron evaluados con ANOVA con factores fijos, y el test de Bonferroni fue aplicado para realizar comparaciones múltiples.

La asociación recíproca entre el par de variables *células GFAP-IR/mm²* y *núcleos BrdU-IR/mm²*, y el par de variables *células IB4+/mm²* y *núcleos BrdU-IR/mm²*, en las franjas cercanas a la zona de lesión, se evaluó con la prueba de *Correlación Lineal de Pearson*.

Para evaluar el efecto de la lesión en el *acoplamiento celular*, se realizó un análisis de distribución de frecuencias usando *Ji-cuadrado de Pearson*. En todos los casos, se fijó un valor de $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

En primer lugar, cabe señalar que la mayoría de los núcleos ($93,95 \pm 9,82$, media \pm DE) que incorporaron BrdU en el sitio de la lesión también expresaron Ki-67, lo que sugiere que la incorporación de BrdU se debió a la replicación del ADN y no a su reparación (Fig. 1.1).

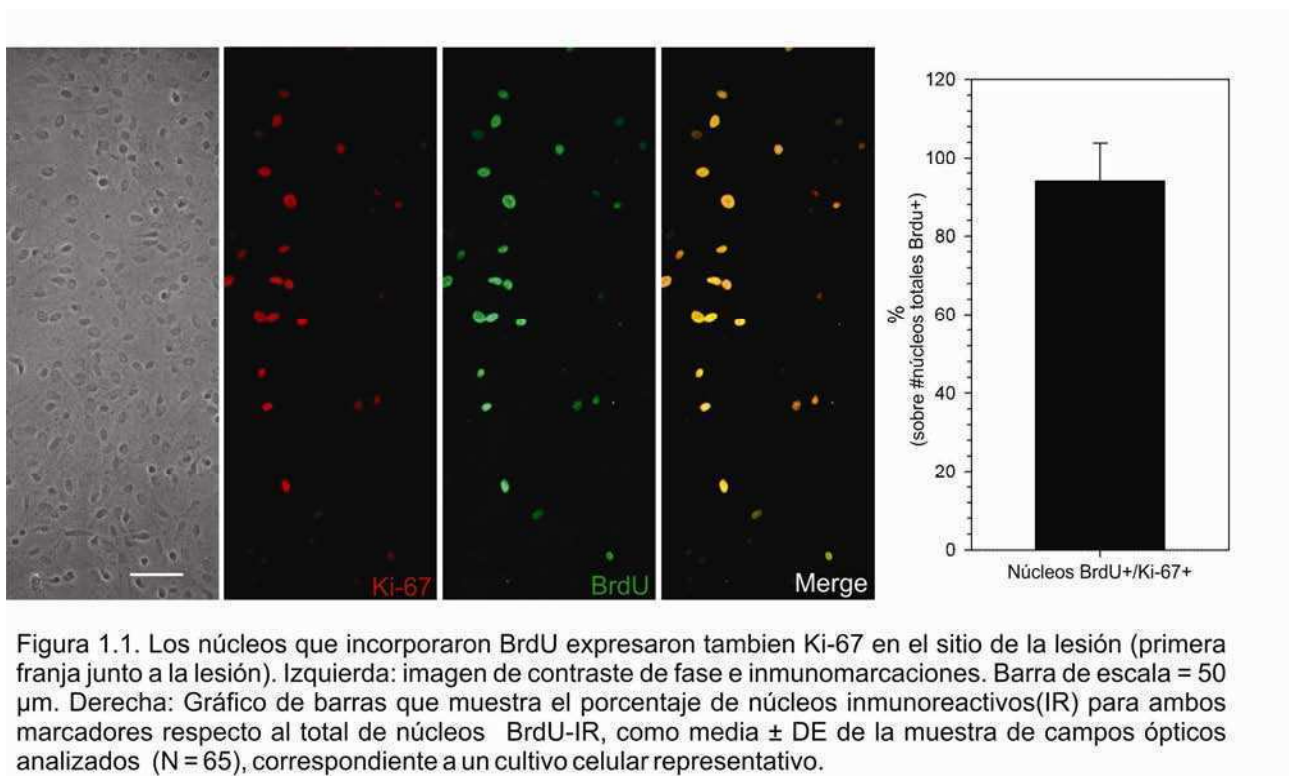


Figura 1.1. Los núcleos que incorporaron BrdU expresaron también Ki-67 en el sitio de la lesión (primera franja junto a la lesión). Izquierda: imagen de contraste de fase e inmunomarcaciones. Barra de escala = 50 μ m. Derecha: Gráfico de barras que muestra el porcentaje de núcleos inmunoreactivos (IR) para ambos marcadores respecto al total de núcleos BrdU-IR, como media \pm DE de la muestra de campos ópticos analizados (N = 65), correspondiente a un cultivo celular representativo.

1. Cultivos enriquecidos en astrogliá

Efecto de las condiciones de confluencia del cultivo enriquecido en astrogliá, sobre la respuesta postlesional

Para evaluar si la respuesta postlesional depende de la maduración del cultivo después de alcanzada la confluencia, cultivos enriquecidos en astrocitos obtenidos de corteza cerebral fueron analizados en dos condiciones de confluencia: reciente (al alcanzar la confluencia) o tardía (1 semana después). En ambos casos, se detectó en los

cultivos lesionados una incorporación de BrdU significativa en las franjas más cercanas a la lesión (centro, dentro de los 200 μm del borde de la herida; $p < 0.02$) en comparación con franjas periféricas a la lesión, así como con las franjas análogas de cultivos no lesionados (control). La distribución BrdU-IR resultó homogénea en cultivos no lesionados ($p > 0,700$ entre las franjas) (Fig. 1.1.1A-E). En las franjas situadas en la periferia de la lesión, la incorporación BrdU-IR resultó similar que en los controles no dañados, en ambas condiciones de confluencia ($p > 0,700$; Fig. 1.1.1E). Además, no se detectaron diferencias significativas en el nivel de respuesta entre ambas condiciones de confluencia ($p > 0,800$; Fig. 1.1.1F), por lo que en los experimentos subsiguientes, los cultivos se utilizaron en estado de confluencia reciente.

Efecto del tamaño de la herida en la respuesta postlesional

En cultivos enriquecidos en astrogliá de la corteza cerebral, la influencia del tamaño de la herida en la respuesta de proliferación fue analizada en los sucultivos, con dos series de diferente ancho de herida: 600 ± 181 y $1754 \pm 652,45$ μm (“angosta” y “ancha”, respectivamente) (Fig. 1.1.2A). No se detectaron diferencias significativas en la respuesta proliferativa postlesional entre ambas series (Fig. 1.1.2B). Por lo tanto, tal respuesta no dependió del tamaño de la herida, y la variante “angosta” fue utilizada en los experimentos subsiguientes.

Dependencia de la respuesta postlesional al suero

La dependencia de la respuesta postlesional al suero, fue evaluada por su privación o su sustitución, en cultivos enriquecidos en astrogliá de la corteza cerebral. Cuando el suero fue eliminado o sustituido por SITE, no se detectó la respuesta proliferativa postlesional observada en presencia de SFB 10% (Fig. 1.1.2C), e incluso los niveles basales de incorporación de BrdU disminuyeron significativamente ($p < 0,05$; Fig.

1.1.2D). Estos resultados sugirieron una dependencia marcada de la respuesta proliferativa postlesional al suero, por lo que la suplementación del medio de cultivo con SFB al 10% fue necesaria en todos los experimentos subsiguientes.

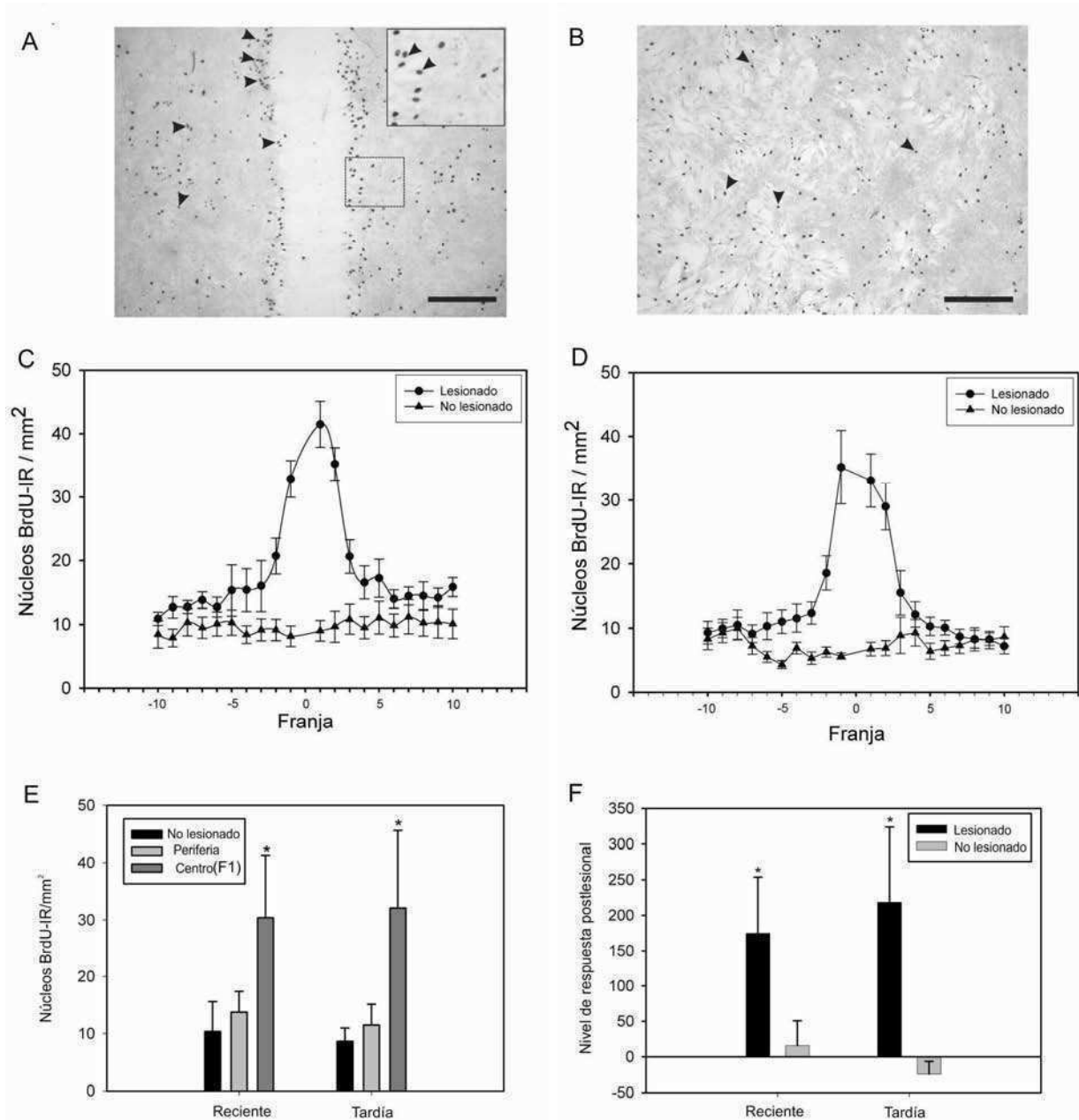


Figura 1.1.1. Distribución de la incorporación nuclear BrdU-IR en cultivos confluentes, enriquecidos en astroglia de la corteza cerebral de la rata. (A) Lesionado y (B) No lesionado. Observe en (A) la densidad de inmunoreactividad en los bordes de la herida, y en (B), la inmunoreactividad nuclear dispersa. La eosina fue utilizada como tinción de contraste. Flechas, núcleos BrdU-IR (DAB). Barra de escala=1000 μ m; inserto=500 μ m. (C)y(D) Efectos de la lesión en la incorporación BrdU-IR en cultivos en condiciones de confluencia (C) reciente y (D) tardía. Media \pm DE (N=9 por punto). (E) Comparación del promedio de la densidad de núcleos BrdU-IR en cultivos no lesionados y lesionados (centro (franja 1) y periferia) y no lesionados, en las dos condiciones de confluencia. Media \pm DE (N=9 por grupo). (F) Nivel de respuesta postlesional en la franja 1 (ver texto para descripción). Franjas equivalentes se analizaron en el caso de cultivos no lesionados. Media \pm DE (n=18 por grupo). * p <0,05 (ANOVA; *Bonferroni's post hoc test para comparaciones múltiples*).

Respuesta postlesional en cultivos de distintas regiones cerebrales

La especificidad regional de la respuesta proliferativa postlesional fue analizada comparando cultivos enriquecidos en astrogliía de corteza cerebral (CC), cuerpo estriado (E) y mesencéfalo ventral (MV). El patrón de la respuesta tanto en E como en MV resultó similar al patrón CC (véase la Figura 1.1.1C), detectándose incorporación de BrdU significativa en las franjas más cercanas a la lesión (200 μm del borde de la herida), comparada con las franjas periféricas o análogas de cultivos intactos ($p < 0,05$). Además, no se detectaron diferencias significativas regionales en el nivel de la respuesta postlesional (Fig. 1.1.3A).

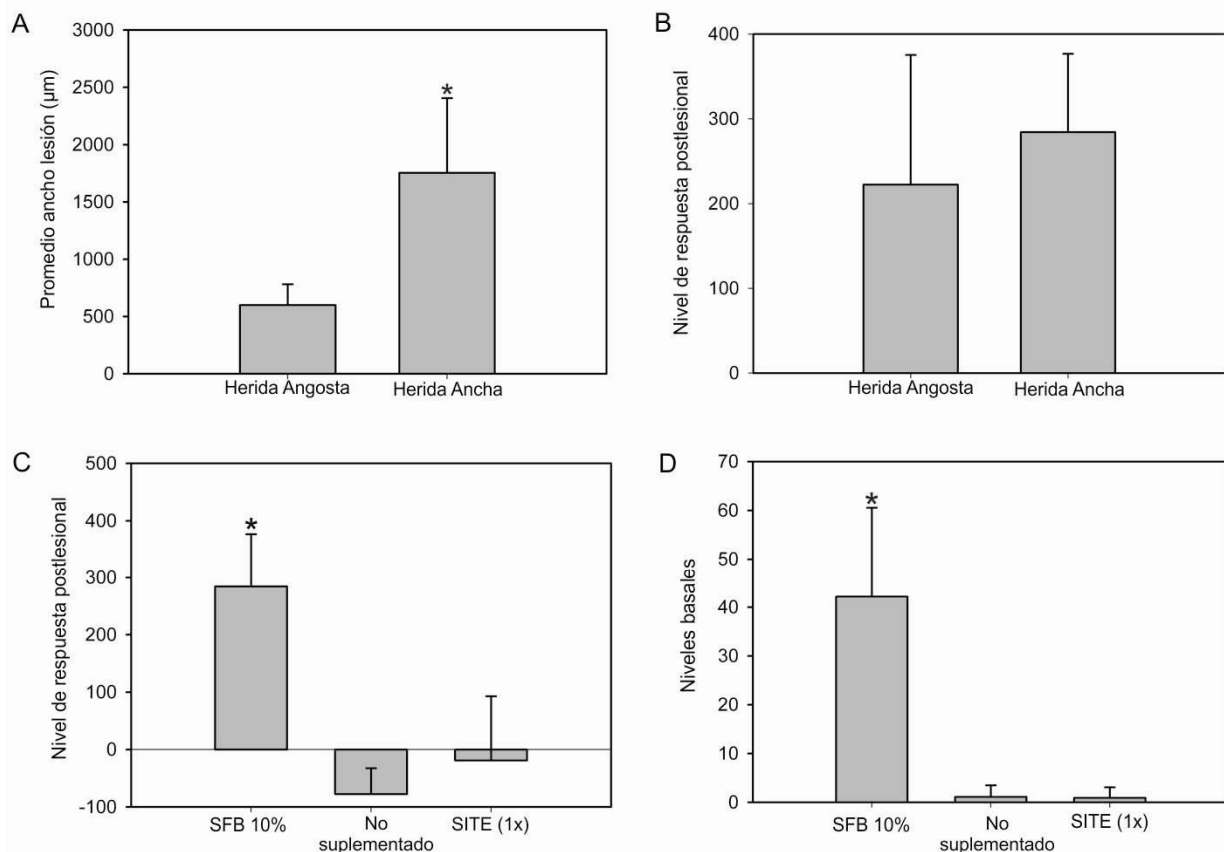


Figura 1.1.2. Efecto del ancho de la herida y de la privación del suero, en la respuesta proliferativa astrogli al postlesional, en cultivos enriquecidos en astrogliía de la corteza cerebral de rata. (A) Promedios de ancho de la herida (N=6 por grupo). (B) Nivel de respuesta postlesional expresado como porcentaje relativo de núcleos BrdU-IR / mm^2 (ver metodología) según las series de tamaño de lesión mostradas en A. Franjas espacialmente análogas se usaron en el caso de cultivos no lesionados (N= 12 por grupo). (C) Efecto de la privación del suero y su sustitución por SITE, sobre la respuesta proliferativa postlesional (N= 8 por grupo). (D) Efecto de la privación del suero y su sustitución por SITE, en los niveles basales de núcleos BrdU-IR / mm^2 , en cultivos no lesionados (N= 4 por grupo). Media \pm DE. * $p < 0.05$ (ANOVA; Bonferroni's post hoc test para comparaciones múltiples).

Evaluación de la posible existencia de factores postlesionales difusibles

En cultivos enriquecidos en astrogliá de la corteza cerebral, se investigó la existencia de una o más posibles moléculas señal, difusibles por medio extracelular o por uniones *gap*, liberadas desde el sitio de la lesión y que podría haber inducido la respuesta astrogliá de proliferación descrita. Para ello, el medio extracelular postlesional fue expuesto a “turbulencia” o lavados, a distintos tiempos luego de la lesión.

La perturbación del medio extracelular postlesional –ya sea por turbulencia o lavado- no produjo ningún cambio significativo en el nivel de de respuesta de incorporación de BrdU cercano a la herida ($p > 0,600$; Fig. 1.1.3B).

Por otra parte, el tratamiento con un bloqueante de uniones *gap* (carbenoxolona, Cbx) aplicado 5 min antes de la lesión y extendido durante la primera hora luego de la lesión, no afectó la respuesta previamente descrita ($p > 0,900$; Fig. 1.1.3C).

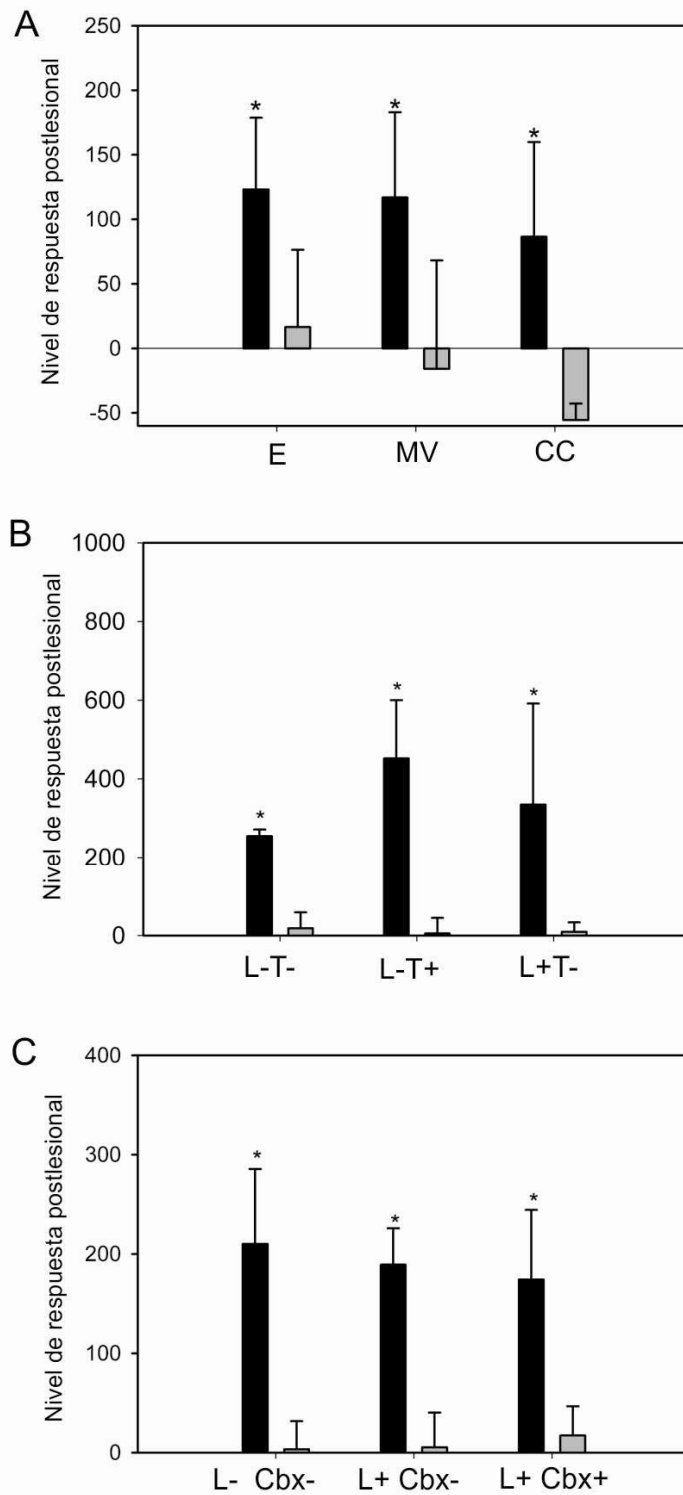


Figura 1.1.3. Nivel de respuesta postlesional. Efecto regional (A) (E:estriado; MV:mescencéfalo ventral; CC: corteza cerebral; N= 6 por grupo), efecto de la perturbación del medio de cultivo (B) (L:lavado; T:turbulencia) (n= 8 por grupo) y del bloqueo de uniones gap con Carbenoxolona (Cbx) 100 μ M (C). Barras negras= Cultivos lesionados. Barras grises= cultivos no-lesionados. Media \pm DE. * $p < 0,05$ con respecto a los cultivos no lesionados (ANOVA; Bonferroni's post hoc test para comparaciones múltiples).

Efecto de la lesión en el estado de acoplamiento astrogial

Dos aspectos principales fueron evaluados en base a un análisis de distribución de frecuencias usando Ji-cuadrado de Pearson. Primero, el *% de acoplamiento celular* en cultivos lesionados, no se diferenció significativamente entre los sitios de 200 μm (centro, franja 1) y 1000 μm (periferia) de distancia a la herida, durante la primera hora después de lesión ($p>0,500$; Fig. 1.1.4A), ni después de 24 horas ($p>0,400$; Fig. 1.1.4B). Tampoco se detectaron diferencias significativas entre lesionados e intactos en cuanto a esta variable de acoplamiento ($p>0,400$; Fig. 1.1.4C).

Otro aspecto evaluado fue la distribución de frecuencias de la *nube celular de acoplamiento* (número de las células marcadas con LY por cada célula inyectada) (Fig. 1.1.5A-C). La nube hallada con mayor frecuencia fue la de 2-5 células tanto en cultivos lesionados (56,4%) como en intactos (83,3%), y no se detectaron diferencias significativas entre las distribuciones de frecuencias de ambas condiciones ($p>0,200$) (Fig. 1.1.5D).

Especificidad celular de la respuesta

Para evaluar si la respuesta proliferativa postlesional descrita es específica a las células astrogiales –o representa un evento más general que se extiende a otros tipos celulares– se lesionaron cultivos enriquecidos en fibroblastos de meninges o piel.

En ambos cultivos de fibroblastos, la incorporación de BrdU fue significativa en las franjas más cercanas a la lesión (dentro de 200 μm del borde de la herida, $p>0,05$), similar a lo observado en cultivos de astrogía (véase la figura 1.1.1C). No se detectaron diferencias significativas entre los tres tipos de cultivo ($p>0,300$; Fig. 1.1.6).

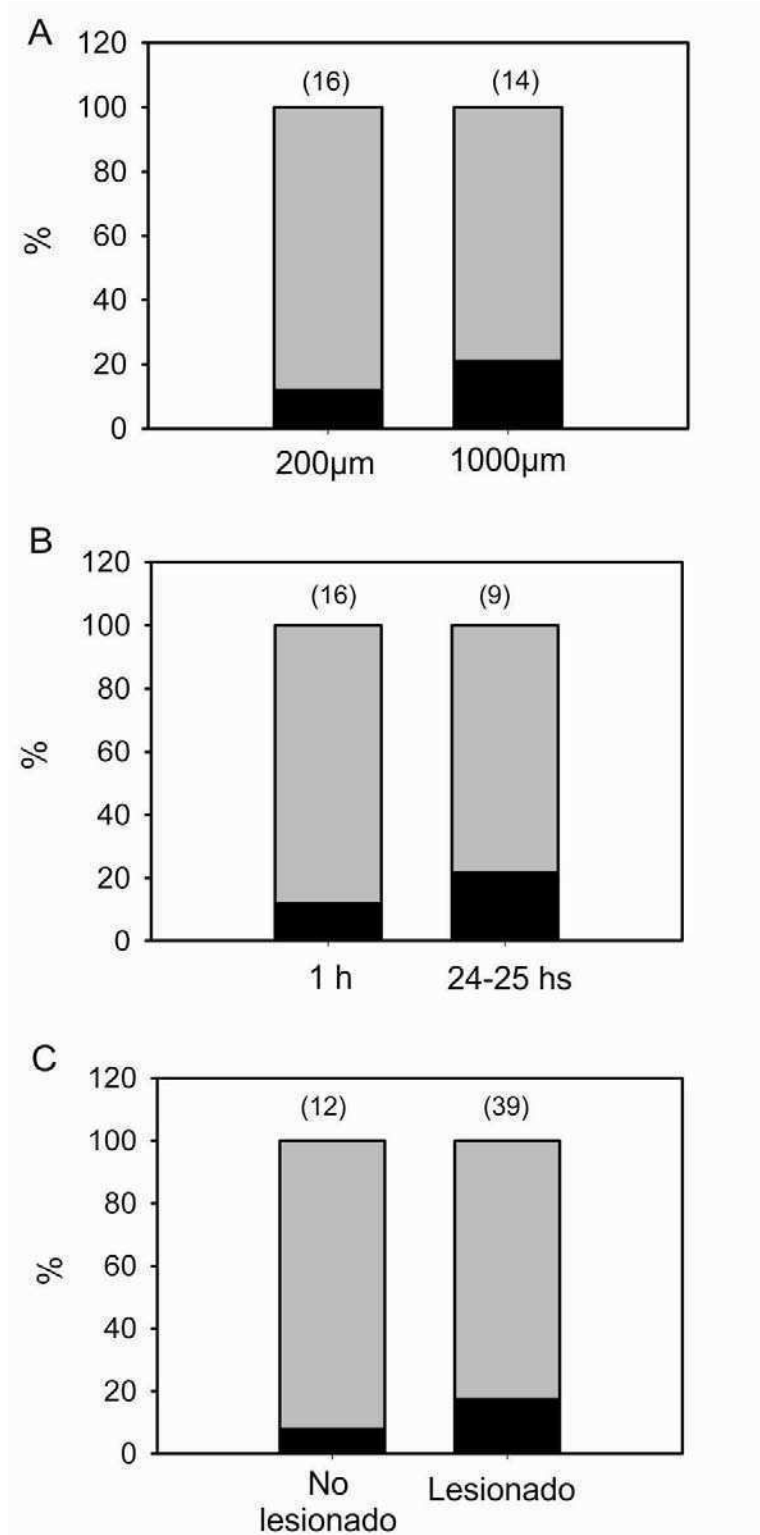


Figura 1.1.4. Porcentaje de acoplamiento celular sobre el total de células inyectadas. (A) Ensayo realizado durante la primera hora luego de la lesión, a 200 µm (centro) y a 1000 µm (periferia) del borde de la herida. (B) Ensayos realizados a 1 h y 24-25 hs luego de la lesión, a 200 µm del borde de la herida. (C) Comparación entre cultivos intactos y lesionados (total de ensayos). Gris, % de células acopladas; Negro, no acopladas. Numeros entre paréntesis indican el N de cada grupo.

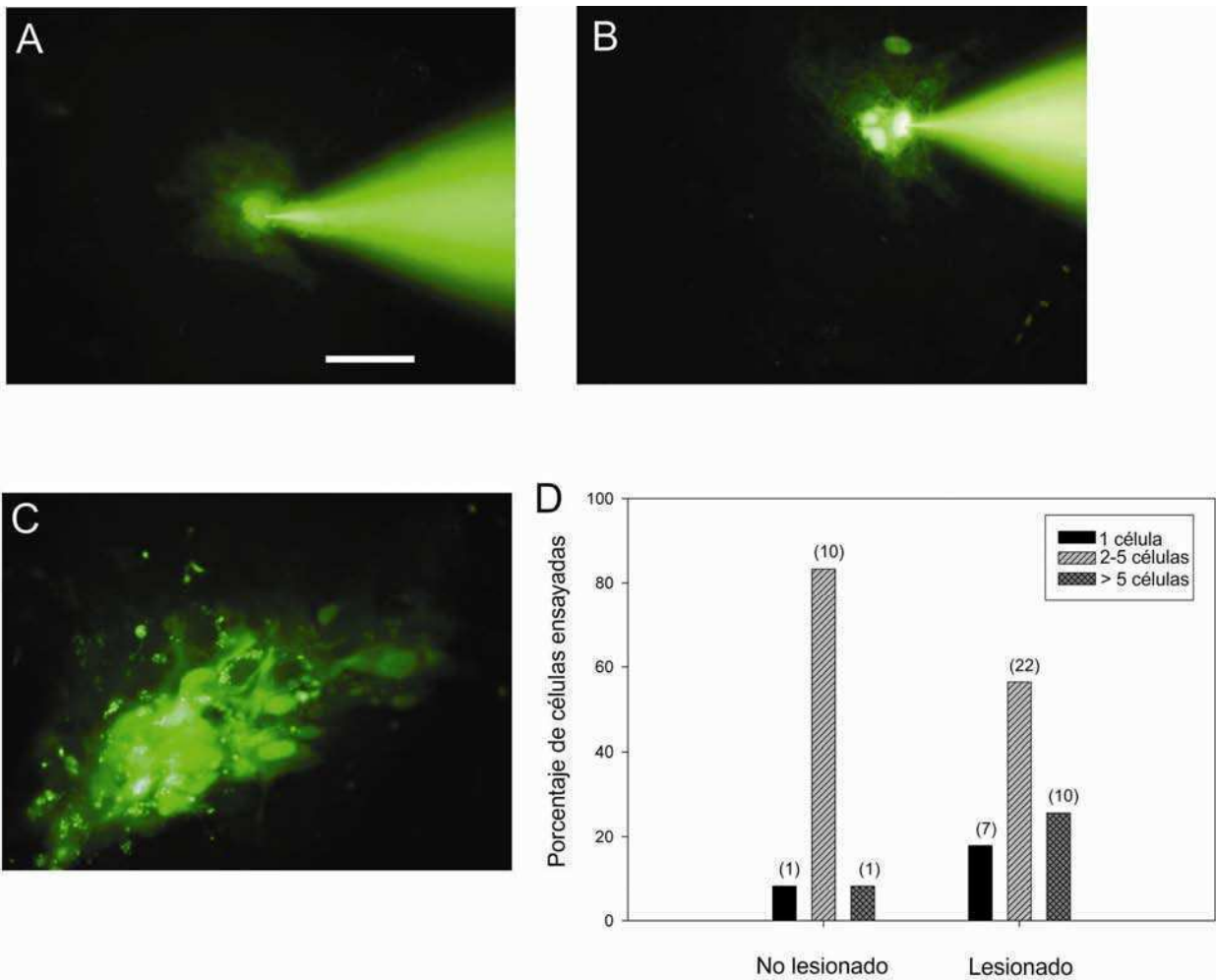


Figura 1.1.5. Nubes de acoplamiento, representando el número de células marcadas con Lucifer Yellow por cada célula inyectada. El patrón de llenado fue clasificado en una de las tres categorías: (A) 1 célula; (B) Nube de 2-5 células; (C) Nube de más de 5 células. Barra de escala, 80 μ m. (D) Distribuciones de frecuencias de las categorías mencionadas, en cultivos lesionados y no lesionados. Los números entre paréntesis indican el N de cada grupo.

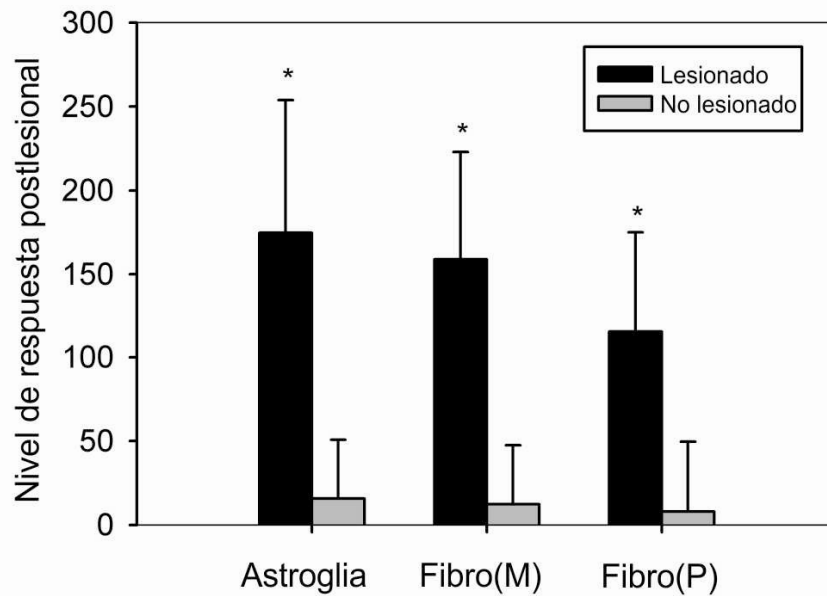


Figura 1.1.6. Análisis comparativo de la respuesta proliferativa postlesional (ver metodología para descripción), en cultivos enriquecidos en astrogliá, o en fibroblastos de meninges (M) o de piel (P). Media±DE. * $p < 0,05$ con respecto a los cultivos no lesionados.

2. Cultivos primarios de composición celular mixta

Respuesta de proliferación en el contexto de un cultivo primario de composición celular mixta

Para continuar con el análisis de la incorporación de BrdU en respuesta a la lesión, se realizó un estudio en cultivos primarios de composición celular heterogénea. Se incluyó un cultivo enriquecido en astrogliá –como los estudiados en el ítem anterior– con fines comparativos. El propósito fue estudiar la respuesta astrogliá a la lesión en un contexto de composición celular más compleja que la que ofrecen los habitualmente utilizados cultivos enriquecidos.

En todos los cultivos primarios mixtos, los tipos celulares más frecuentes fueron astrogliá y microglia (Tabla 1.2.1). A pesar de que se utilizaron procedimientos

sistemáticos para su obtención, se detectó entre estos cultivos, una variabilidad intrínseca referida a su composición de células astrogliales y microgliales. Con respecto a la composición en oligodendroglía, si bien el cultivo # 5 fue el único que difirió ligeramente de los otros cultivos mixtos (Bonferroni, $p < 0,03$), la proporción de oligodendrocitos se mantuvo relativamente constante entre cultivos y fue inferior a la de los otros componentes gliales (véase tabla 1.2.1). El porcentaje de neuronas fue bajo (alrededor del 1%) y no se encontraron diferencias significativas entre los cultivos primarios mixtos en cuanto a la composición neuronal (Prueba de Kruskal-Wallis H, $p = 0,239$). El subcultivo enriquecido en astroglia se caracterizó por $95,30 \pm 0,50\%$ de células inmunoreactivas para GFAP.

Tabla 1.2.1. Composición de los cultivos primarios mixtos y de un subcultivo enriquecido en astroglia, expresada como porcentajes de los tipos celulares por caracterización inmunocitoquímica.

Cultivo #	CD11b(microglia)	MBP(oligo)	NeuN(neurona)	GFAP(astroglia)
1	50,19 \pm 1,69**	6,05 \pm 0,96	1,25 \pm 0,35	42,51 \pm 1,04
2	22,70 \pm 1,41	2,91 \pm 2,39	1,23 \pm 0,74	73,16 \pm 2,37
3	6,82 \pm 0,56	1,19 \pm 0,11	1,24 \pm 0,43	90,65 \pm 0,34
4*	4,70 \pm 0,10	0,00	0,00	95,30 \pm 0,50
5	17,62 \pm 6,97	9,89 \pm 4,73	3,38 \pm 2,28	69,11 \pm 4,45
6	11,74 \pm 5,27	11,52 \pm 5,35	2,60 \pm 1,37	74,15 \pm 14,34
7	15,37 \pm 5,99	3,94 \pm 2,11	1,20 \pm 0,31	79,48 \pm 4,95
8	11,50 \pm 3,45	8,43 \pm 2,62	1,23 \pm 1,08	78,83 \pm 3,91
9	14,26 \pm 5,17	2,66 \pm 1,06	1,17 \pm 0,82	81,92 \pm 13,09
10	24,30 \pm 7,54	4,80 \pm 2,54	1,91 \pm 0,98	68,99 \pm 15,20

*Subcultivo enriquecido. ** Porcentajes expresados como media \pm DE, de 3 cubreobjetos por marcador, por cultivo.

Dadas estas características de los cultivos, para cada caso se calculó la relación (ratio) microglía:astroglía (Tabla 1.2.2). Con el fin de analizar la respuesta general de incorporación de BrdU después de la lesión y su distribución espacial, los cubreobjetos con los cultivos celulares se agruparon de acuerdo a esa relación: Grupo A (1:1), cubreobjetos del cultivo # 1; Grupo B (1:3), cubreobjetos de los cultivos # 2, 5 y 10; Grupo C (1:6,1:7), cubreobjetos de los cultivos # 6, 7, 8 y 9; Grupo D (1:13), cubreobjetos del cultivo # 3; Grupo E (1:20), cubreobjetos del cultivo # 4 (subcultivo enriquecido en astroglía).

Tabla 1.2.2. Relación microglía:astroglía en los cultivos celulares utilizados en este estudio.

Cultivo #	Microglia	Astroglia
1	1	1
2	1	3
10	1	3
5	1	3
7	1	6
6	1	6
9	1	6
8	1	7
3	1	13
4*	1	20

*Subcultivo enriquecido

Posteriormente, se analizó el efecto de la lesión en el grado de proliferación como incorporación de BrdU y su distribución espacial.

En algunos de los casos (cubreobjetos) pertenecientes a cada grupo de los cultivos primarios mixtos, y en el cultivo enriquecido, se encontró una respuesta postlesional de incorporación de BrdU similar a la observada en los experimentos con cultivos enriquecidos en astroglía descritos en el ítem anterior de esta sección (*casos reactivos*). Sin embargo, algunos casos pertenecientes a cada grupo de los cultivos primarios, no respondieron a la lesión (*casos no reactivos*). Mientras que todos los pertenecientes al

grupo D (el cual se acerca a una condición de cultivo enriquecido en astrogliá) y aquellos pertenecientes al grupo E, mostraron una distribución de la incorporación de BrdU nuclear con valores máximos cercanos en las franjas de la lesión (Fig. 1.2.1.A), algunos casos de los grupos A, B y C no respondieron a la lesión con la incorporación de BrdU (Fig. 1.2.1.C, D).

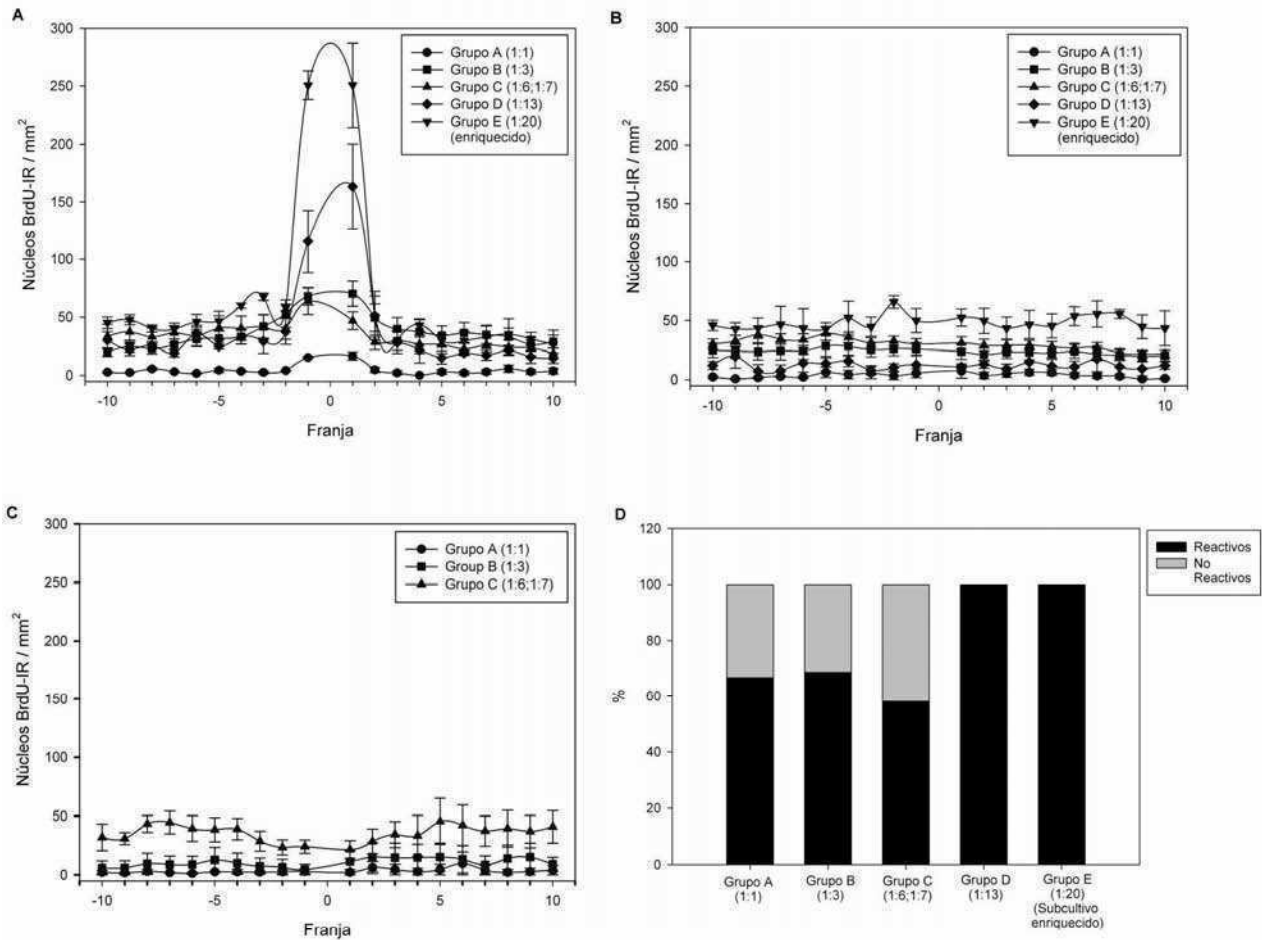


Figura 1.2.1. Distribución de los núcleos BrdU-IR en los cultivos primarios mixtos y en el subcultivo enriquecido en astrogliá, de la corteza cerebral de rata. (A) Casos (cubreobjetos) *reactivos* pertenecientes a cada grupo de los cultivos analizados. (B) Controles intactos. (C) Casos (cubreobjetos) *no reactivos* pertenecientes a cada grupo de los cultivos analizados. Los datos se muestran como la media \pm DE ($N_{\text{grupos A,D,E}} = 6$; $N_{\text{grupo B}} = 24$; $N_{\text{grupo C}} = 18$). (D) Porcentaje de casos *reactivos* y *no reactivos* de cada grupo de cultivos. Los números entre paréntesis indican el ratio microglia:astrogliá de cada grupo de cultivos.

Asimismo, se detectaron diferencias significativas entre los grupos en el nivel de respuesta postlesional (Fig. 1.2.2.A, $p < 0,01$). Con un análisis *pos hoc* sólo se detectaron diferencias significativas entre D o E con el resto de los grupos (Turkey, $p < 0,05$). Sin

embargo, los datos sugieren que existiría una tendencia de aumento de la respuesta proliferativa a la lesión cuanto mayor es la proporción de células astrogiales presentes en el cultivo (Fig. 1.2.2.A).

Para confirmar esta observación estadísticamente, se realizó un análisis de regresión lineal simple para estudiar la relación entre la proporción relativa de astrogía con respecto a la microglia (pra), y el nivel de respuesta postlesional (nrp). El análisis mostró que esta relación puede ser descrita mediante una función lineal ($nrp = -2,84 + 24,70 pra$), con un coeficiente de asociación de 24,7, y un nivel de significancia de $p < 0,001$ (Fig. 1.2.2.B). El coeficiente de determinación $R^2 = 0,32$, implica que el modelo propuesto de regresión explica un 32% de la variabilidad total del sistema en estudio en las presentes condiciones biológicas. Se obtuvieron resultados similares en una prueba de regresión cuadrática.

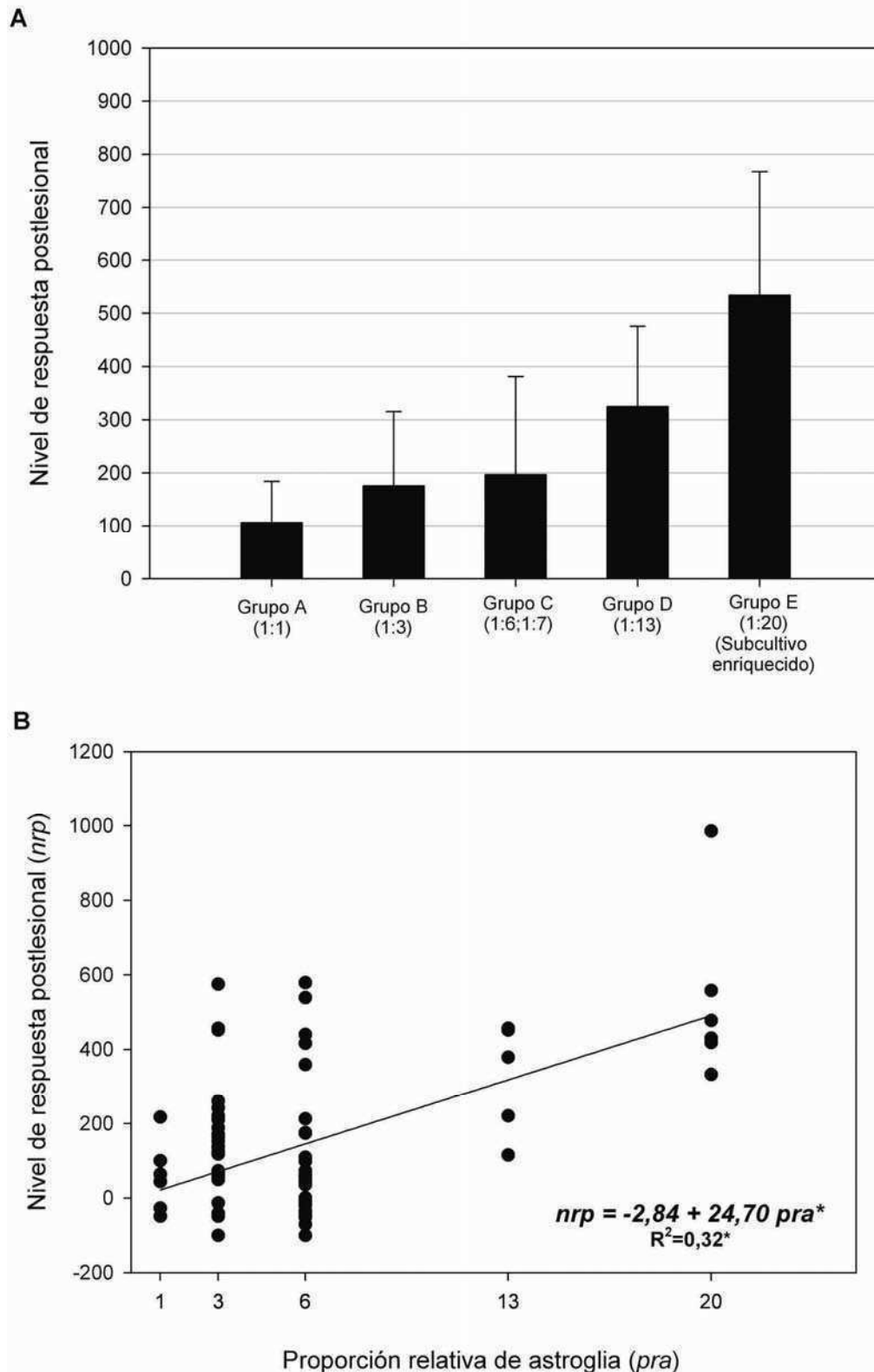


Figura 1.2.2. Nivel de respuesta proliferativa postlesional expresada como porcentaje de núcleos BrdU-IR/mm², calculado de acuerdo con la siguiente fórmula: [media (franja1 - periferia / periferia) x 100]. (A) Análisis comparativo de los casos reactivos de todos los grupos de los cultivos celulares analizados. Los números entre paréntesis indican el ratio microglia: astroglia de cada grupo. (B) Diagrama de dispersión y línea de regresión para las variables *Nivel de respuesta postlesional* y *proporción relativa de astroglia*. se muestran la fórmula de regresión y el coeficiente de determinación R². * p<0,001.

Dados los resultados obtenidos, se evaluó la densidad de microglía y astrogliá en la zona de lesión, y su asociación con núcleos BrdU-IR/mm². Para ello se limitó el análisis a la primera franja de 200 µm (franja 1), a ambos lados de la herida en todas las muestras de cultivos lesionados, pertenecientes a todos los cultivos primarios estudiados, incluyendo el cultivo enriquecido en astrogliá (Tabla 1.2.3).

Tabla 1.2.3. Estadística descriptiva de la densidad de células astrogliales GFAP-IR/mm², núcleos BrdU-IR/mm², microglía IB4+/mm² y dobles marcaciones, en la primera franja de 200 µm, a ambos lados de la lesión en cada grupo de cultivos.

GRUPO	PARAMETROS	GFAP	BrdU	GFAP;BrdU	IB4	IB4;BrdU
A	N	6	6	6	6	6
	media	77,78	4,92	4,92	51,39	0,00
	DE	17,26	3,40	3,40	49,89	0,00
	mínimo	43,84	1,10	1,10	3,20	0,00
	p50	83,06	4,80	4,80	45,00	0,00
	máximo	90,16	10,96	10,96	142,03	0,00
B	N	38	38	38	38	38
	media	160,39	53,65	46,12	72,09	3,05
	DE	59,17	42,16	36,84	57,40	5,48
	mínimo	61,29	0,00	0,00	0,00	0,00
	p50	143,48	55,93	47,83	58,99	0,00
	máximo	278,67	132,00	126,00	221,75	21,05
C	N	40	40	40	40	40
	media	154,87	46,11	41,18	91,64	1,83
	DE	55,45	34,54	31,27	50,08	3,02
	mínimo	12,96	0,00	0,00	25,07	0,00
	p50	154,23	37,04	31,45	79,77	0,00
	máximo	260,00	132,61	130,43	221,15	13,11
D	N	6	6	6	6	6
	media	331,06	141,27	139,43	50,47	1,68
	DE	65,72	58,58	56,57	52,70	2,06
	mínimo	265,33	72,00	72,00	0,00	0,00
	p50	307,34	137,92	137,09	36,99	0,83
	máximo	426,67	228,89	224,44	134,45	4,45
E	N	6	6	6	6	6
	media	362,42	250,71	250,71	0,00	0,00
	DE	17,13	42,10	42,10	0,00	0,00
	mínimo	333,33	194,74	194,74	0,00	0,00
	p50	366,67	238,60	238,60	0,00	0,00
	máximo	379,31	318,97	318,97	0,00	0,00

Se encontró que la mayoría de los núcleos BrdU-IR de la franja 1, pertenecían a células GFAP-IR ($91,05 \pm 17,10 \%$; $\text{media} \pm \text{DE}$ de todos los cultivos), mientras que muy pocos de ellos se asociaron a microglia ($4,28 \pm 11,74 \%$; $\text{media} \pm \text{DE}$ de todos los cultivos) (Fig. 1.2.3). Sin embargo, las células microgliales de la zona de lesión (franja 1) mostraron un fenotipo morfológico indicativo de un estado reactivo, caracterizado por el engrosamiento de los procesos proximales y la disminución de las ramificaciones distales, al igual que morfología ameboidea (Fig. 1.2.3. B,D).

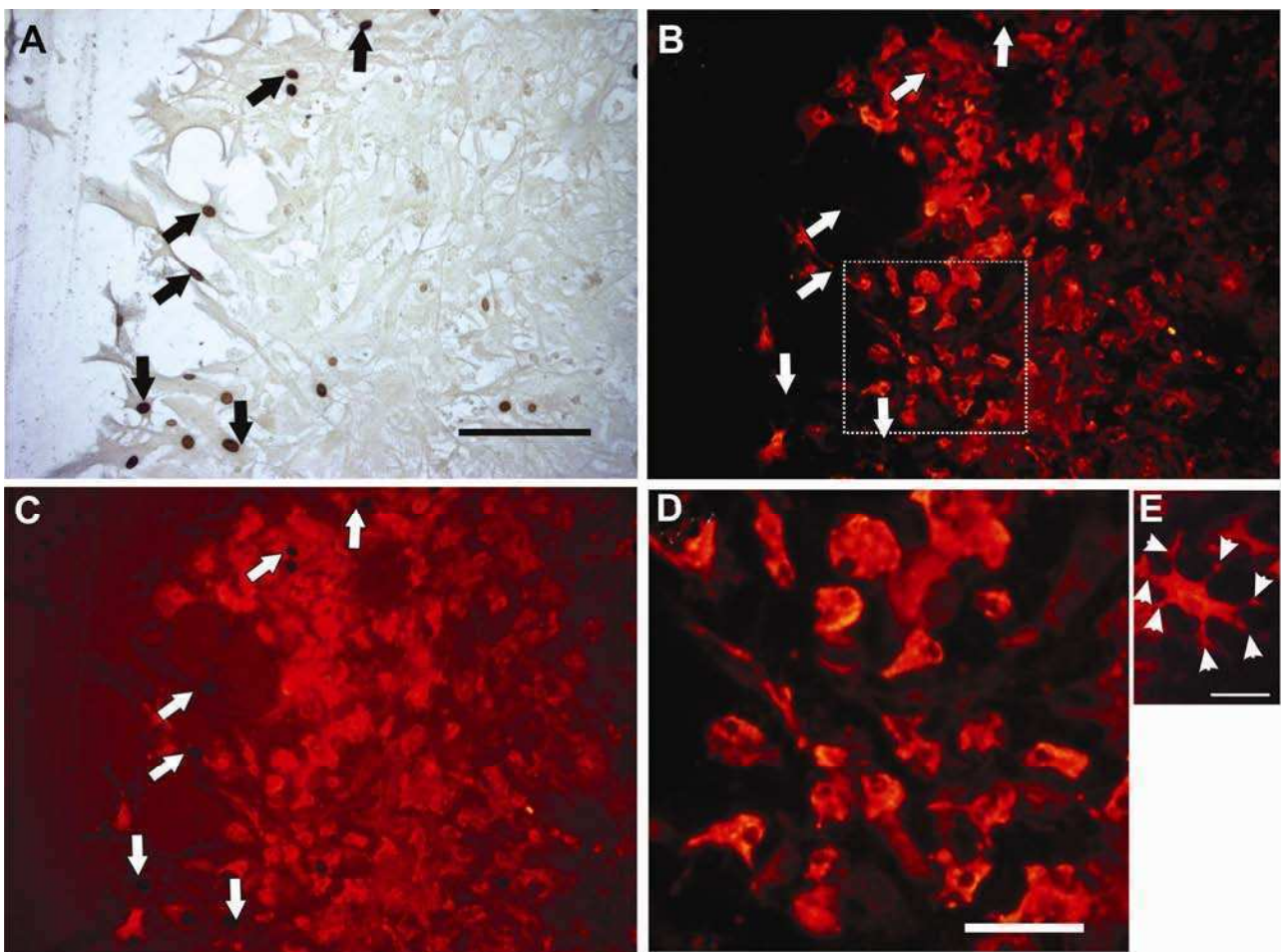


Figura 1.2.3. Los núcleos que incorporaron BrdU (DAB) (flechas) se encontraron pertenecientes a células astrogliales GFAP-IR (DAB + Ni) (A), pero muy pocos a microglia IB4 + (Cy3) (B). (C) superposición de imágenes A y B. Barra de escala (A,B,C) = $150 \mu\text{m}$. (D) Inserto en B: células de la microglia expresan diferentes estadios de activación, que se caracterizan por el engrosamiento de los procesos proximales, disminución de ramificaciones, o morfología ameboidea. Barra de escala = $50 \mu\text{m}$. (E) Célula de la microglia con morfología no reactiva ubicada distante a la lesión. Nótese la cantidad de ramificaciones finas (cabezas de flechas), características de una célula no reactiva, a diferencia de lo observado en (D). Barra de escala = $25 \mu\text{m}$.

A fin de proporcionar apoyo estadístico a la observación de que la variabilidad de la densidad de la microglía y astrogliá se asocia con la densidad de los núcleos BrdU-IR totales en la herida, se realizó un estudio de correlación lineal de Pearson. Se analizaron la densidad de GFAP-IR/mm², IB4 + / mm² y núcleos BrdU-IR/mm² en todos los cultivos primarios mixtos lesionados, incluyendo el subcultivo enriquecido en astrogliá. Los diagramas de dispersión de datos se muestran en la Figura 1.2.4. El coeficiente de correlación positivo obtenido $r=0,800$ (con una significancia $p<0,0001$) indica un fuerte grado de asociación entre las variables GFAP-IR/mm² y BrdU-IR/mm², cuyos valores varían en la misma dirección (correlación positiva). Por otro lado, la correlación entre las variables IB4 + / mm² y BrdU-IR/mm², no alcanzó significancia ($p=0,153$), con un coeficiente de correlación $r=-0,147$, lo que sugiere que no hay asociación entre la respuesta general de incorporación nuclear de BrdU y las células microgliales.

Efecto de la lesión en el estado de acoplamiento astrogliá, en el contexto de un cultivo primario de composición celular mixta

El *porcentaje de acoplamiento celular* fue evaluado en cultivos primarios mixtos, intactos (basal) y lesionados (Tabla 1.2.4). Las inyecciones se realizaron en células ubicadas en la franja 1, a tiempos de 1 hora y 24 horas, posteriores a la lesión (Tabla 1.2.5). No se detectaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en la distribución de frecuencias, tal como fue observado en los cultivos enriquecidos en astrogliá.

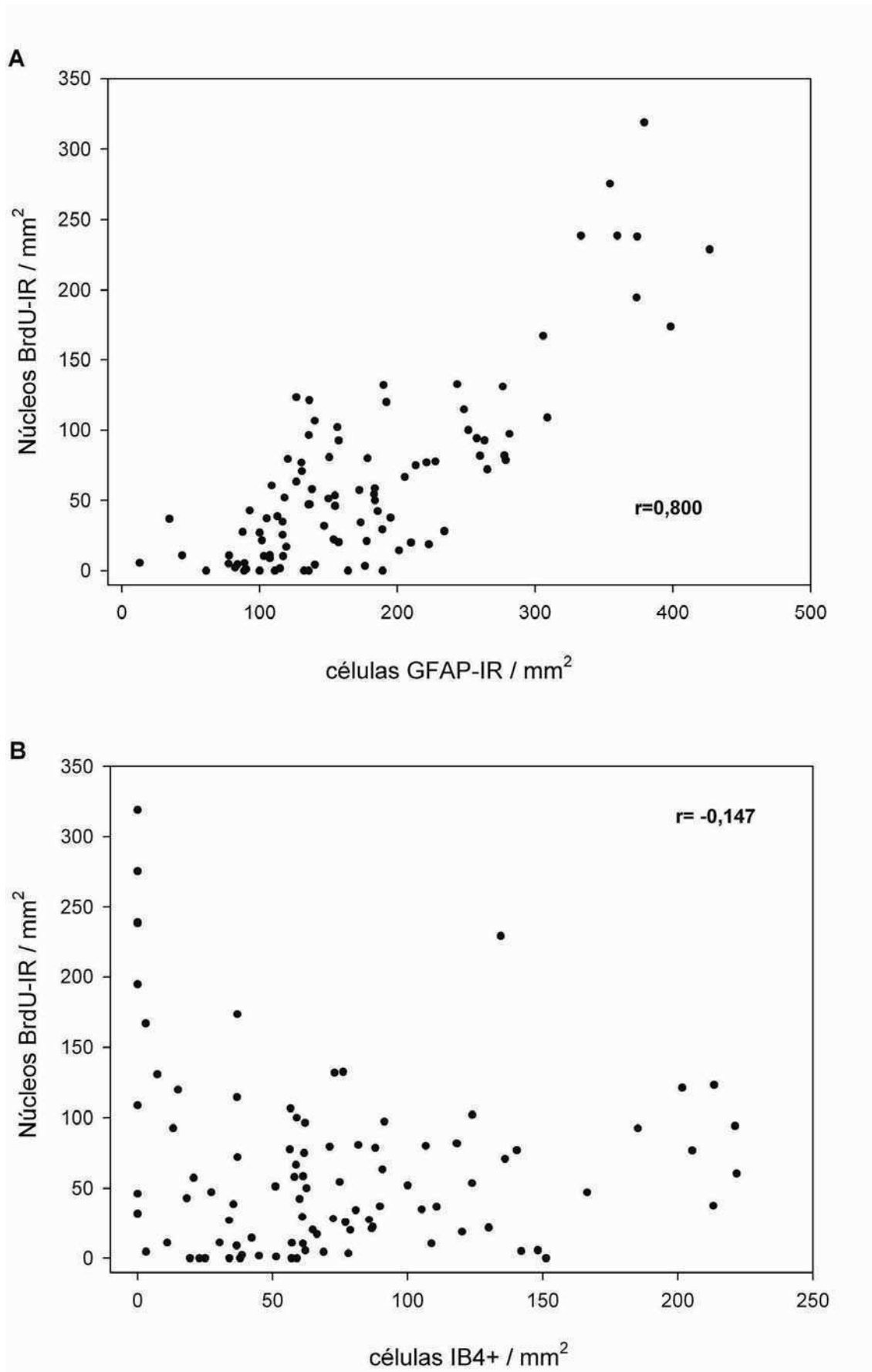


Figura 1.2.4. Diagramas de dispersión y coeficiente de correlación (r) para núcleos BrdU-IR/ mm^2 y células GFAP-IR/ mm^2 (A), y para los núcleos BrdU-IR / mm^2 y células IB4+ / mm^2 (B). Obsérvese la mutua asociación en A, pero no en B, evaluado con la prueba de correlación lineal de Pearson.

Tabla 1.2.4. Distribución de frecuencias de acoplamiento en cultivos primarios mixtos, lesionados e intactos.

P=0,599, Ji-cuadrado de Pearson			Acoplamiento		Total
			No	Si	
Condición	Intacto	Conteo	26	13	39
		%	66,7	33,3	100,0
	lesionado	Conteo	35	22	57
		%	61,4	38,6	100,0
Total		Conteo	61	35	96
		%	63,5	36,5	100,0

Tabla 1.2.5. Distribución de frecuencias de acoplamiento en cultivos lesionados durante la primera hora posterior a la lesión y las 24-25hs subsiguientes.

P=0,752, Ji-cuadrado de Pearson			Acoplamiento		Total
			No	Si	
Tiempo postlesión	24-25 hs	Conteo	16	11	27
		%	59,3	40,7	100,0
	dentro de 1 h	Conteo	19	11	30
		%	63,3	36,7	100,0
Total		Conteo	35	22	57
		%	61,4	38,6	100,0

DISCUSIÓN

La regeneración neural, la reorganización de circuitos y la recuperación funcional del tejido tras daño cerebral dependen significativamente de una cascada local de eventos celulares y subcelulares (Amat y cols., 1996; Wang y cols., 2004; Dávalos y cols., 2005; Fetler y Amigorena, 2005; Pforte y cols., 2005) y de las características de la cicatriz resultante en el tejido (Giulian y cols., 1993; Bähr y Bonhoeffer, 1994; Sivron y Schwartz, 1995; Louw y cols., 1997; Privat, 2003). En un intento por profundizar el análisis de algunos de estos eventos, se han propuesto modelos *ex vivo* utilizando sistemas de cultivos celulares (Yu y cols., 1993; Ghirnikar y cols., 1994; MC Millian y cols., 1994; Hou y cols., 1995; Faber-Elman y cols., 1996; Mukhin y cols., 1998; Wu y Schwartz, 1998; Környei y cols., 2000; Mandell y cols., 2001). Este estudio contribuye al análisis de variables que podría modular la respuesta astrogliosa postlesional en sistemas de cultivos.

Con este propósito, se analizaron cultivos celulares confluentes enriquecidos en astrogliosis en términos de incorporación nuclear de bromodeoxiuridina y acoplamiento celular siguientes una "lesión por raspado" (*scratch-wound*). Asimismo los cultivos se expusieron a diversos procedimientos o factores para evaluar la modulación de la respuesta postlesional.

Por un lado, la maduración del cultivo luego de alcanzada la confluencia y el tamaño de la herida no resultaron factores que modifiquen dicha respuesta postlesional, en las condiciones descritas. Evidencias de un estudio de microscopía electrónica (Skoff, 1975) de células marcadas con [3 H]-timidina en el nervio óptico lesionado *in vivo*, apoya la idea de que el grado de proliferación de las células reactivas alrededor de una herida, en realidad dependen de la gravedad del trauma. Esta discrepancia aparente genera motivos para considerar si cultivos enriquecidos en astrogliosis podrían proporcionar un

modelo *in vitro* viable para analizar los procesos *in situ*. Esta cuestión se analizó aún más mediante otros criterios.

Debido a la heterogeneidad regional descrita entre astrocitos de diferentes regiones cerebrales (Wilkin y cols., 1990; Lanosa y cols., 2008), fueron obtenidas muestras de células de la corteza cerebral, cuerpo estriado y mesencéfalo ventral, y evaluadas en la respuesta proliferativa. Los resultados obtenidos sugieren que la astrogliá proveniente de las regiones del cerebro analizadas, no se diferencia en cuanto a la respuesta de incorporación de BrdU postlesional, en las condiciones enunciadas.

También se evaluó la posibilidad de que la lesión induzca la liberación por la astrogliá, de ciertos factores mitogénicos difusibles específicos, que activen la respuesta proliferativa descrita en este estudio. El diseño experimental fue pensado suponiendo la posibilidad de existencia de microgradientes de citoquinas alrededor del área de lesión. Las perturbaciones del medio celular subsiguientes a la lesión -la turbulencia del medio de cultivo, o su sustitución repetida (lavados) durante un período de cuatro horas postlesional- no alteraron la respuesta postlesional obtenida, lo que sugiere que ésta respuesta no depende de una molécula liberada desde la lesión, difusible por medio extracelular.

Además, la respuesta de proliferación fue totalmente dependiente del suero, coincidiendo con ciertas evidencias acerca de la detención del ciclo celular causada por privación de suero (Chou y Langan, 2003; Hayes y cols., 2005). La interrupción de la barrera hematoencefálica en casos de lesiones cerebrales, libera en el tejido nervioso hormonas y factores de crecimiento del suero, que inducirían proliferación de astrocitos y otras células gliales, las cuales contribuyen a la formación de la cicatriz en el foco de la lesión (Landis, 1994). Por ejemplo, Nadal y cols. (1995) informaron que la albúmina estimula la síntesis del ADN en astrocitos, lo que explicaría en parte la suero-dependencia de la respuesta postlesional descrita en este estudio.

De acuerdo con Giaume y McCarthy (1996), la interconexión de astrocitos a través de uniones *gap* intercelulares define una red funcional dinámica. De hecho, se ha informado que las respuestas gliales a la lesión *in vivo*, incluyen la presencia de astrocitos reactivos a una distancia considerable del foco principal dañado (Norenberg, 1994; Amat y cols., 1996). Por otra parte, se ha informado que la expresión de conexina 43 -la proteína de unión *gap* que predomina en el sistema nervioso central- se redistribuye en astrocitos reactivos tras una lesión (Hossain y cols., 1994; Ochalski y cols., 1995). Por lo tanto, se esperaba que la lesión no sólo afectara el acoplamiento de las células directamente dañadas, sino que también el de las más distantes, conectadas por medio de sucesivas uniones *gap*. Sin embargo, los resultados obtenidos en cuanto al grado de acoplamiento tras la lesión no sugieren ninguna modificación en el estado de acoplamiento astroglial por la lesión, ya sea en cultivos enriquecidos en astroglía, como en cultivos primarios de composición celular mixta. Por otra parte, los resultados de los experimentos con bloqueantes de uniones *gap*, sugieren que ningún factor difusible por unión *gap* se vincularía a la proliferación astroglial observada en respuesta a la lesión. Estas observaciones indican que el acoplamiento celular no se altera significativamente, ni representa un mecanismo fundamental en las respuestas celulares tras la lesión de cultivos celulares.

Colectivamente, los resultados presentados tenderían a restar importancia a la hipótesis de que exista algún factor difusible involucrado en la incorporación nuclear de BrdU, que tiene lugar después de una lesión en cultivos confluentes enriquecidos en astroglía.

Finalmente, la respuesta proliferativa observada no pareció ser específica de la astroglía, dado que cultivos de otros tipos celulares que –como la astroglía– crecen por adherencia al substrato (fibroblastos de meninges y de piel) responden a la lesión de una manera similar. Estos resultados sustentan entonces, la idea de que la respuesta de

incorporación de BrdU observada en estos modelos estaría inducida probablemente por la interrupción de la *inhibición por contacto celular*, por el 'vacío' generado luego de realizar la lesión por raspado del cultivo confluyente (Zegers et al., 2003). Las células que crecen por adherencia al sustrato en cultivos *in vitro* -incluyendo astrocitos-, dejan de proliferar después de haber llegado a confluencia y puede mantenerse el cultivo en monocapa durante varias semanas, como resultado de la inhibición de la proliferación por contacto celular. Este fenómeno también se considera un mecanismo regulador durante el desarrollo, en el tejido en crecimiento (Nakatsuji y Miller, 1998; 2001; Cheng y cols., 2005; Coller y cols., 2006), que parece ser regulado por glicoproteínas transmembrana **cadherinas**, que promueven la adherencia célula-célula dependiente de calcio, involucrada en el fenómeno (Levenberg y cols., 1999; Soler y cols., 1999, ver también Lanosa y Colombo, 2008).

En los **cultivos primarios mixtos**, a pesar de que se realizaron procedimientos sistemáticos para la obtención y el mantenimiento, se detectó una variabilidad intrínseca entre ellos con respecto a su composición celular astrogliar y microglial. Vale la pena señalar, que la variabilidad en la composición de astrogliá y microglia de cultivos celulares primarios ha sido mencionada por otros autores (Codeluppi y cols., 2010). Sin embargo, todos los procedimientos se realizaron de forma sistemática, teniendo en cuenta los aspectos metodológicos que podrían influir en la proporción de los tipos celulares gliales en el cultivo (Saura, 2007), incluyendo el uso de un único lote de suero. En base a nuestra experiencia previa de que el medio libre de suero –con o sin un suplemento (*SITE*, Sigma)– suprimió la respuesta postlesional de incorporación de BrdU en subcultivos enriquecidos en astrogliá (ver sección *Resultados* de este capítulo y ref. Lanosa y Colombo, 2007), se evitaron estas condiciones en la presente serie de experimentos.

Asimismo, la densidad de oligodendroglía y neuronas se mantuvo relativamente baja y casi constante entre los cultivos mixtos. Con el fin de focalizar este estudio en la

respuesta proliferativa postlesional de poblaciones de células astrogliales y microgliales, el medio de cultivo utilizado no incluyó factores de crecimiento neuronal (Roth y cols., 2010). Por lo tanto, como era de esperar, el porcentaje de neuronas se mantuvo en torno al 1%.

Los cultivos primarios de corteza cerebral lesionados mostraron significativa incorporación nuclear de BrdU predominantemente en la franja cercana a la herida (franja 1), como se había observado previamente en los subcultivos enriquecidos en astroglia (ver sección 1 de este capítulo y ref. Lanosa y Colombo, 2007). La falta o reducida incorporación de BrdU en algunos casos, parecería depender de la densidad de astroglia GFAP-IR en la zona de la lesión, según lo indicado por la regresión lineal y las pruebas de correlación de Pearson. En este sentido, un coeficiente de correlación de Pearson $r = 0,800$ sugiere una fuerte asociación positiva entre la densidad de los núcleos BrdU-IR (respuesta proliferativa general) y la densidad de astrocitos GFAP-IR, en la herida. Esto significa que las dos variables aleatorias varían juntas de una manera directa.

La prueba de regresión lineal simple resultó muy significativa ($p < 0,001$), por lo que el modelo matemático obtenido sirve para describir la relación entre la proporción relativa de astroglia (*pra*) y el nivel de respuesta postlesional (*nrp*), en las condiciones descritas de los cultivos utilizados en este estudio. De acuerdo con la función lineal estimada: $nrp = -2,84 + 24.70.pra$, con cada incremento unitario en *pra*, *nrp* aumenta 24.7 veces. Además, este modelo, sirve para **predecir** valores de *nrp* a partir de valores de *pra*, dentro de cultivos utilizados en este estudio. Dado que se obtuvo un $R^2 = 0,32$, se infiere que –con este modelo- la proporción relativa de astroglia en el cultivo celular explica el 32% de la variabilidad en la respuesta postlesional. Esto significa que hay una serie de variables (no controlables) no incorporadas en el modelo de regresión que también influirían en el nivel de respuesta postlesional. Éstas pueden estar relacionadas por ejemplo, con la variabilidad entre animales, y/o entre las muestras dentro de cada cultivo (nro. 1-10) o

grupo de cultivos (letras A-E). Resultados similares se obtuvieron en un análisis de regresión cuadrática, por lo que se optó por el modelo de regresión lineal por ser el más simple (principio de parsimonia).

Estudios previos (Röhl y cols., 2007) sugieren la activación de la astrogliá por la microglía. Sin embargo, nuestros resultados muestran que las células de microglía IB4 + (en reposo y activadas) no se asociaron con la respuesta de incorporación nuclear de BrdU en los tiempos experimentales aplicados en este modelo *in vitro*, también sustentado por la prueba de correlación aplicada. La falta de este tipo de respuesta de la microglía sugiere que el modelo actual no incluye las condiciones requeridas para que dicho proceso tenga lugar. Aunque nuestros resultados sugieren que la proliferación de la microglía no ocurrió en este modelo de lesión *in vitro*, hay evidencia morfológica de un estado reactivo –tal vez relacionado con la activación microglial temprana (fase 1)–, como se ha informado que ocurre *in vivo* y que demuestra que la microglia responde rápidamente a las lesiones que afectan la supervivencia neuronal (Amat y cols., 1996; Raivich y cols., 1999; Dávalos y cols., 2005; Fetler y Amigorena, 2005). Por lo tanto, la posibilidad de que la microglia reactiva, pero no proliferante, esté involucrada en las respuestas de incorporación de BrdU astrogliá, no pudo ser completamente descartada.

La ruptura de la barrera hematoencefálica está estrechamente relacionada con el desarrollo y la progresión de enfermedades del SNC (Kim y cols., 2006; Cui y cols., 2009), y es quizás el acontecimiento más significativo en la regulación del microambiente del SNC tras una lesión. Por lo tanto, la falta de células sanguíneas, con características pro inflamatorias y que liberen citoquinas, podría ser considerada como unas de las causas de falta de respuesta proliferativa de la microglía en nuestro modelo.

CONCLUSIONES

En resumen, de acuerdo con los resultados experimentales, los cultivos confluentes enriquecidos en astrogliá y los cultivos primarios de composición celular mixta – provenientes de cerebro de neonatos de rata– responden a una lesión con proliferación celular, limitada en el espacio local de la herida. En consecuencia, estos y otros resultados sugieren que no hay una molécula difusible por medio extracelular o por unión *gap* vinculada a la proliferación de astrocitos observada luego de una lesión producida en las condiciones enunciadas. Además, considerando que la respuesta fue compartida por otros tipos celulares no gliales (fibroblastos) en condiciones experimentales similares, se considera que los resultados observados se explican mejor con el concepto de ***interrupción/liberación de la inhibición por contacto celular***. Los resultados obtenidos en los cultivos primarios mixtos también apoyan esta observación.

Cabe agregar, que en los cultivos celulares mixtos, la respuesta proliferativa predominantemente astrogliá observada depende de la densidad relativa de estas células, y es similar a la observada en cultivos enriquecidos en astrogliá. La falta de células sanguíneas pro inflamatorias en el presente modelo *in vitro*, puede explicar la falta de una respuesta postlesional proliferativa asociada a microglia, aunque, sin embargo se encontró microglia con morfología reactiva.

Aunque el fenómeno de *interrupción de la inhibición por contacto celular* podría ser considerado como parte de los eventos que tendrían lugar durante el proceso de reparación tras una lesión del parénquima cerebral, este estudio advierte sobre las limitaciones del uso de cultivos enriquecidos en astrogliá sistemas de cultivo *in vitro*, como modelos apropiados para el análisis experimental de los complejos procesos celulares que ocurren después de una lesión del tejido nervioso *in vivo*. Salvando las limitaciones antes mencionadas, puede proporcionar sin embargo un medio útil para analizar particularmente las ‘señales’ específicas que podrían mediar tales respuestas astrogliáles, y su interacción con otras células del tejido nervioso.

CAPÍTULO II

“ANÁLISIS DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA, LOCAL Y DISTANTE, LUEGO DE
UNA LESIÓN QUIRÚRGICA PROGRAMADA EN LA CORTEZA CEREBRAL DE MONOS
CEBUS APELLA ADULTOS”

‘Podría estar encerrado en una cáscara de nuez y sentirme rey de un espacio infinito’

William Shakespeare (Hamlet)

INTRODUCCIÓN

La deaferentación sensorial posterior a una lesión medular produce una masiva reorganización cortical (Pons y cols., 1991; Reisin y Colombo, 2004), mediada por la degeneración de las fibras espino-talámicas. Es de suponer entonces que una lesión cortical focalizada cause efectos corticales distantes, que se extiendan más allá del daño local, mediados por la degeneración de fibras cortico-corticales y de proyección, y de la distribución de los territorios vasculares involucrados. En tales casos, a nivel local, las células sobrevivientes y las que migran hacia la zona lesionada, proliferan, y aumenta la expresión de citoquinas y marcadores celulares específicos, además de manifestarse cambios en las moléculas secretadas y modificaciones en la morfología celular (Lindsay, 1986; Landis, 1994; Hampton y cols., 2004). Estos cambios estructurales y la difusión extracelular de citoquinas locales, así como la formación de una cicatriz mayormente de origen glial –compuesta por procesos astrogliales entrelazados por uniones gap (Ridet y cols., 1997)– pueden afectar la función y reorganización postlesional del neuropilo local perilesional (Bähr y cols., 1994; Privat, 2003).

Mientras que las respuestas celulares locales posteriores a lesiones corticales mecánicas han sido intensamente estudiadas (véase como ejemplo, Landis, 1994; Amat y cols., 1996; Hampton y cols., 2004), los efectos celulares en sitios corticales remotos –es decir, a distancia del sitio de lesión primario–, no fueron caracterizados en especies de primates. Tales efectos dependerían de mecanismos estructurales y funcionales, tales como los proporcionados por fibras de asociación y proyección neuronales, la dimensión real del “*sincicio panglial*” (Dermietzel y Spray, 1998), y la distribución de los territorios vasculares afectados. Por tal razón, el análisis de efectos remotos puede dar información adicional para la comprensión de la reorganización cortical –estructural y funcional– y los procesos de recuperación, luego de una lesión en la corteza cerebral.

Proliferación, apoptosis y reparación celular son probablemente los cambios celulares más notorios que caracterizan a una respuesta al daño neuronal (Bähr y cols., 1994; Landis, 1994; Hampton y cols., 2004).

Por último cabe señalar, que en el cerebro humano, hay astrocitos GFAP-IR específicos del Orden de los primates (*astrocitos interlaminares*) (Colombo y cols., 1995; 2001; 2004). Por otra parte, los astrocitos protoplasmáticos de primates presentan algunas características *–in vivo e in vitro–* que los distinguen de su contraparte en roedores (Oberheim y cols., 2006; Lanosa y cols., 2008). De acuerdo con Takano y cols. (2009), el microdominio funcional de un astrocito protoplasmático en el neuropilo de primate es significativamente mayor que el de uno en el neuropilo de roedor. Dadas estas diferencias entre la astrogliá de primates y la de roedores, la utilización de modelos de primates no humanos -cuando esta al alcance de las posibilidades- con el fin de analizar más a fondo las respuestas postlesionales, podría contribuir de manera más específica a la comprensión de los procesos corticales de reorganización y recuperación, posteriores a una lesión en la corteza cerebral de humanos.

En este contexto, en este estudio se analizó la posibilidad de modificaciones celulares en sitios corticales remotos tras una lesión cerebral focalizada en la *corteza estriada* (visual) o *prefrontal* de monos *Cebus apella* adultos. Para ello se utilizaron procedimientos de inmunohistoquímica dirigidos a la detección de incorporación nuclear de bromodeoxiuridina (BrdU) como indicador de la proliferación celular (Franke y cols., 1999; Környei y cols., 2000; Kee y cols., 2002) y a su caracterización con marcadores de elementos neuronales y gliales.

METODOLOGÍA

Animales

En estos experimentos, se utilizaron monos *Cebus apella* machos adultos (N=6), nacidos y alojados en cautiverio (CIRHE, CEMIC) bajo condiciones controladas y conformes al Reglamento de NRC (1996) para el cuidado de animales. Los procedimientos utilizados en este estudio fueron aprobados por el comité de ética institucional del CEMIC. Se realizó una ablación cortical limitada en 4 monos y se incluyeron 2 monos intactos como controles.

Procedimientos quirúrgicos

Las lesiones corticales fueron realizadas por un neurocirujano pediatra (A.Y.), en animales inmovilizados con ketamina y bajo anestesia respiratoria intratraqueal con halotano (N=4). Luego de fijar la cabeza en un marco estereotáxico, con infiltración anestésica periauricular, se realizó una craneotomía en las ubicaciones deseadas. La duramadre se cortó y se retiró cuidadosamente. Todos los animales recibieron una ablación cortical unilateral (derecha). El abordaje quirúrgico en la *corteza prefrontal dorsolateral*, se realizó en dos de los monos, dorsal al surco recto¹. En otros dos animales, la cirugía se realizó en la *corteza estriada* (área visual 17). En ambos casos, se utilizó un cuchillo quirúrgico de tipo Hálasz en forma de “U”, que consiste en un alambre de acero inoxidable afilado, montado en un tubo de acero inoxidable conectado al marco estereotáxico. La sección horizontal fue de 4 mm y la barra vertical terminal, de 2 mm de longitud. Este instrumento penetró hasta 2,5 mm de la superficie cortical, con el propósito de reducir el daño quirúrgico de la sustancia blanca subyacente, y desplazado 4 mm para crear una lonja de tejido que luego fue retirada. Después de completar los procedimientos

¹ **Abreviaturas de los surcos y giros (de Manocha y cols., 1968).**

Fs=Fissure Sylvii, *o*=Sulcus orbitalis, *oc*=Sulcus occipitalis anterior, *pc*=Sulcus precentralis inferior, *pcs*=Sulcus precentralis superior, *poc*=Fissura and sulcus parieto-occipitalis, *rs*=Sulcus rostralis, *scm*=Sulcus calloso-marginalis, *sip*=Sulcus intraparietalis, *slc*=Sulcus centralis, *sr*=Sulcus rectus, *sts*=Sulcus temporalis superior, *ti*=Sulcus temporalis inferior, *gfi*=Gyrus frontalis inferior, *gpc*=Gyrus precentralis, *gpa*=Gyrus parietalis anterior, *ga*=Gyrus angularis, *gfm*=Gyrus frontalis medialis, *gts*=Gyrus temporalis superior, *gtm*=Gyrus temporalis medius.

de lesión, la cavidad se cubrió con una esponja coagulante estéril. La duramadre se volvió a colocar, y la tapa de hueso obtenida durante la craneotomía fue reubicada y sellada con cemento dental. La incisión quirúrgica fue cerrada con sutura discontinua.

Luego de finalizar los procedimientos mencionados, los animales recibieron una inyección intramuscular de antibiótico (gentamicina, 40 mg), de analgésico (ibuprofeno, 50 mg), y de antiinflamatorio (dexametasona, 70 mg). Posteriormente los animales fueron regresados a sus jaulas y observados periódicamente hasta su recuperación de la anestesia.

Administración de bromodeoxiuridina (BrdU)

La bromodeoxiuridina (Sigma) fue diluida en solución fisiológica e inyectada por vía intraperitoneal bajo sedación con ketamina, a la dosis de 80 mg/kg en los días 2, 5 y 9 posteriores a la cirugía.

Fijación del tejido

Tres días después de la última inyección de BrdU (12 días posteriores a la lesión), los animales recibieron una sobredosis de tiopental sódico, y luego fueron perfundidos por vía transcardíaca con solución fisiológica heparinizada, seguido por paraformaldehído 4 % en buffer (ph 7.2). Los cerebros y esófagos fueron fijados por inmersión por un período adicional de 24 horas, luego embebidos en sacarosa y finalmente almacenados a -70° C.

Inmunohistoquímica/inmunofluorescencia

Los cortes en crióstato de 40 μm fueron procesados para tinción de Nissl e inmunohistoquímica/inmunofluorescencia en procedimientos de "*corte flotante*". El bloqueo de peroxidasa endógena se realizó por incubación con H_2O_2 (1 % H_2O_2 30

volúmenes, en 80 % etanol, 20 % buffer fosfato 0,1 M) durante 30 minutos. Después de lavarse los cortes con PBS, se incubaron en HCl 1 N para desnaturalización de ADN, 1 hora a 37 ° C. A continuación, se neutralizó con 2 lavados con borato de sodio 0,1 N, durante 10 minutos cada lavado. Los cortes se incubaron en 0,25 % Tritón X (TX) en PBS/gel durante 5 minutos, para asegurar la penetración de los anticuerpos. El anticuerpo monoclonal de ratón anti-BrdU (1/200 en PBS/gel/TX/Ácida sódica; Roche) se aplicó por 48 horas a 4 ° C. Luego, se incorporó el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con biotina (1/200 en PBS/gel/TX; Sigma), durante 2 horas, a temperatura ambiente. El revelado se realizó con estreptavidina-peroxidasa-diaminobenzidina. Luego de la deshidratación, se realizó montaje en medio anhidro.

En casos de doble inmunomarcación, la detección del segundo antígeno se hizo después de la inmunomarcación de BrdU.

Para investigar la naturaleza de la respuesta a distancia de incorporación de BrdU y evaluar si los núcleos marcados corresponden a células ciclando y potencialmente proliferantes, se analizó la coincidencia entre la marca BrdU-IR y la de un marcador endógeno de células en fase de ciclo celular, Ki-67. En este caso, el BrdU se reveló con anticuerpo 2rio conjugado con AlexaFluor 488 (1/400, Invitrogen) y se utilizó un anticuerpo anti-Ki-67 (policlonal de conejo, 1//100; Millipore), posteriormente revelado con anti-IgG de conejo conjugado con AlexaFluor 635 (1/200; Invitrogen). Los cortes se montaron en medio acuoso sin previa deshidratación.

Para analizar la identidad celular de los núcleos BrdU-IR se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-GFAP y anti-vimentina (anticuerpos monoclonales de ratón, conjugados con CY3; dilución 1/1000; Sigma); anti-Glutamino sintetasa (dilución 1/500, Chemicon) seguido de incubación con anti-IgG de cabra, conjugado con TexasRed (dilución 1/200, Sigma); Isolectina B4 conjugada con biotina (dilución 1/100; Vector laboratories), seguido de incubación con estreptavidina conjugada con Cy3 (dilución

1/200, Jackson Immunoresearch Laboratories) (ambos son gentileza del Lic. Rodolfo Tarelli y el Dr. Fernando Pitossi, Instituto Leloir); anti-NeuN (dilución 1/1000; Chemicon), seguido de incubación con anti-IgG de conejo, conjugado con Cy2 (dilución 1/200, Sigma). Para evaluar la coincidencia con la marcación de BrdU, asimismo se intentó la inmunomarcación de células NG2 utilizando anticuerpos provenientes de: *Santa Cruz Biotechnology*, *Chemicon (dos lotes)*, *Pharmigen*, y dos clones de anticuerpos anti-NG2 cedidos gentilmente por el profesor William Stallcup (Sanford-Burnham, Instituto de investigaciones médicas, La Jolla, USA). Los cortes se montaron en medio acuoso sin previa deshidratación.

En todos los casos, como control de especificidad de la marcación, se procesaron cortes en donde se omitió el primer anticuerpo.

Análisis de la marcación

La *zona de lesión* fue identificada en cortes teñidos con técnica de Nissl, en base a la presencia de una cicatriz y la ausencia de una citoarquitectura cortical organizada. La *zona perilesional* se definió como la región cortical adyacente al límite de cicatriz, en la que la citoarquitectura cortical en columnas estaba aparentemente intacta y había además células vimentina-IR.

Para investigar la distribución cortical de la densidad de núcleos BrdU inmunoreactivos por unidad de superficie ($BrdU-IR/mm^2$), se seleccionaron y analizaron sistemáticamente cortes topográficamente equivalentes entre todos los animales incluidos en este estudio, de las áreas prefrontal, frontal, parietal, temporal y occipital. El criterio utilizado en la selección de los cortes se basó en el interés por analizar las áreas corticales lesionadas y aquellas remotas funcionalmente relacionadas con éstas. En cada área cortical de cada animal, se analizaron 2-3 grupos (*perfiles*) de cortes, de 3 cortes seriados cada uno.

La cuantificación de núcleos BrdU-IR se realizó con un microscopio de campo claro (Leica DMLB) a un aumento final de 100X utilizando una cuadrícula con unidades de 1x1mm de lado. Los campos ópticos analizados al microscopio fueron contiguos entre sí, a lo largo del perímetro de la corteza. El análisis fue realizado sólo en las láminas corticales supragranulares debido a que el aumento de la densidad de BrdU-IR fue más manifiesto en éstas, mientras que los valores de densidad en las láminas granular e infragranulares no superaron el valor máximo observado en los controles (no se muestran estos datos).

Para cada animal lesionado, un solo corte como ejemplo de cada perfil se representó en un esquema del cerebro de *Cebus apella*, en el cual se definieron 5 intervalos de densidad $BrdU-IR/mm^2$ utilizando una escala de grises. Los intervalos de densidad se establecieron de la manera siguiente. El intervalo más bajo correspondió a los valores obtenidos en el animal intacto (0-13 núcleos BrdU-IR / mm^2), mientras que el intervalo más alto fue representado por los valores en la zona de lesión. Para poder obtener una representación más analítica de la densidad, este último intervalo y el intervalo intermedio restante, a su vez se subdividieron en función del valor de la *mediana* correspondiente a cada uno de ellos.

Para investigar la naturaleza de la respuesta postlesional de incorporación de BrdU en los sitios corticales remotos a la lesión de los animales operados, se analizó la coincidencia entre la marca BrdU-IR (Alexa 488, verde) y Ki-67-IR (Alexa 635, rojo), y evaluar así, si los núcleos marcados corresponden a células ciclando y potencialmente proliferantes. Para ello, de cada mono operado se analizaron 3 cortes seriados de la corteza parietal, dado que fue el área cortical distante reactiva común a ambos tipos de lesión (prefrontal y striada). Se barrieron 10 campos por corte a una magnificación de 400X con un microscopio confocal (Olympus FV 300, Láser de Ar verde 488nm, 10mW; Láser de HeNe rojo 633nm, 10mW, perteneciente al Servicio de Microscopia Confocal de

la FCEyN-UBA). Por cada campo se escanearon 4 subcampos en el eje z, por lo que de cada campo se obtuvieron 4 imágenes en cada canal por separado (rojo, Ki-67, y verde, BrdU). La coincidencia BrdU/Ki-67 se evaluó en cada imagen utilizando el programa ImageJ (versión 1.43u). Para ello, se fijó un umbral de detección de los núcleos y se cuantificó la cantidad de núcleos en cada imagen binaria de cada canal en particular. La cuantificación de los núcleos doblemente marcados se realizó sobre imágenes binarias resultantes de la multiplicación entre las imágenes binarias del canal rojo (Ki-67) con las del verde (BrdU) (subcampo a subcampo). El resultado se expresó como un promedio entre los 3 cortes, del porcentaje de núcleos doblemente marcados, relativo al total de núcleos BrdU-IR.

La caracterización de las células corticales con núcleos BrdU-IR se realizó con inmunomarcaciones dobles y evaluando la existencia de coincidencia entre la marcación de BrdU y el marcador del tipo celular correspondiente (ver sección *Inmunohistoquímica/inmunofluorescencia*). Se utilizó para ello, un microscopio Zeiss 35 M Axiovert equipado con epifluorescencia, y un microscopio confocal sólo cuando la observación al microscopio de epifluorescencia dió indicios de una coincidencia entre la marcación de BrdU y el marcador del tipo celular en particular. El análisis se realizó dentro de las zonas lesionada y perilesional, y en los sitios corticales remotos.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de la distribución cortical de la respuesta de proliferación se realizó con la colaboración del Lic. Fernando Poletta, perteneciente al grupo de apoyo en estadística del CEMIC. Se utilizó el programa STATA en la versión 8.0. No se pudo asegurar la normalidad del conjunto de valores de la variable *cantidad de núcleos BrdU-IR/mm²*, con la prueba de *Kolmogorov-Smirnov*, ni la homogeneidad de las varianzas con la prueba de *Levene*. Aplicando transformaciones a la variable, en ningún caso se logró

homogeneizar las varianzas, por lo que no se utilizaron modelos estadísticos paramétricos. De hecho, las varianzas resultaron muy altas en los monos lesionados y muy distintas entre los casos, además de que superaron en gran medida a la media muestral (ver las tablas de estadística descriptiva 2.2 y 2.3, en la siguiente sección).

Debido a esta característica del grupo de datos, se utilizó para el análisis el *Modelo de Regresión Binomial Negativa* (Hilbe, 2007) ajustado para efectos de no-independencia dentro de clusters (area+mono =30 clusters), para evaluar si los resultados pueden ser explicados por la existencia de una lesión (si hay efecto de la lesión), teniendo en cuenta la variabilidad entre áreas corticales y entre monos.

Por otra parte, se realizó la prueba de *Tendencia* para no-paramétricos, de Cuzick (1985) y Altman (1991), para evaluar si la respuesta a la lesión sistemáticamente decrece desde el sitio de lesión. La prueba evalúa si hay tendencia a través de grupos/factores ordenados de datos. En este caso se usaron los *perfiles* como grupos. La idea fue, entonces, evaluar si había una tendencia desde los *perfiles* situados en el área cortical que contiene la zona de lesión, hacia los de las otras áreas, y si la tendencia era positiva (aumento de la respuesta) o negativa (disminución de la respuesta) a través de los *perfiles*.

RESULTADOS

Distribución cortical de la respuesta de proliferación

La lesión en la corteza cerebral produjo una pérdida de su arquitectura, evidenciado con tinción de Nissl (Fig. 2.1A,B). Los cortes de esófago de todos los animales se utilizaron como controles internos de la incorporación de BrdU. En todos los casos se observó una inmunomarcación intensa nuclear de las células de la mucosa, al igual que en los núcleos celulares que incorporaron BrdU en la corteza cerebral en zonas

de lesión y distantes (remotas), lo que sugiere células en fase "S" del ciclo celular (Fig. 2.1).

En la corteza cerebral de los animales intactos se halló un valor de densidad mínimo de 0 y un valor máximo de 13 *núcleos BrdU-IR/mm²* (Fig. 2.1C; Tabla 2.1), con la marcación asociada a los vasos sanguíneos en la mayoría de los casos. Núcleos BrdU-IR también fueron encontrados en las regiones subventriculares. No se encontró ninguna evidencia de células BrdU-IR en el hipocampo.

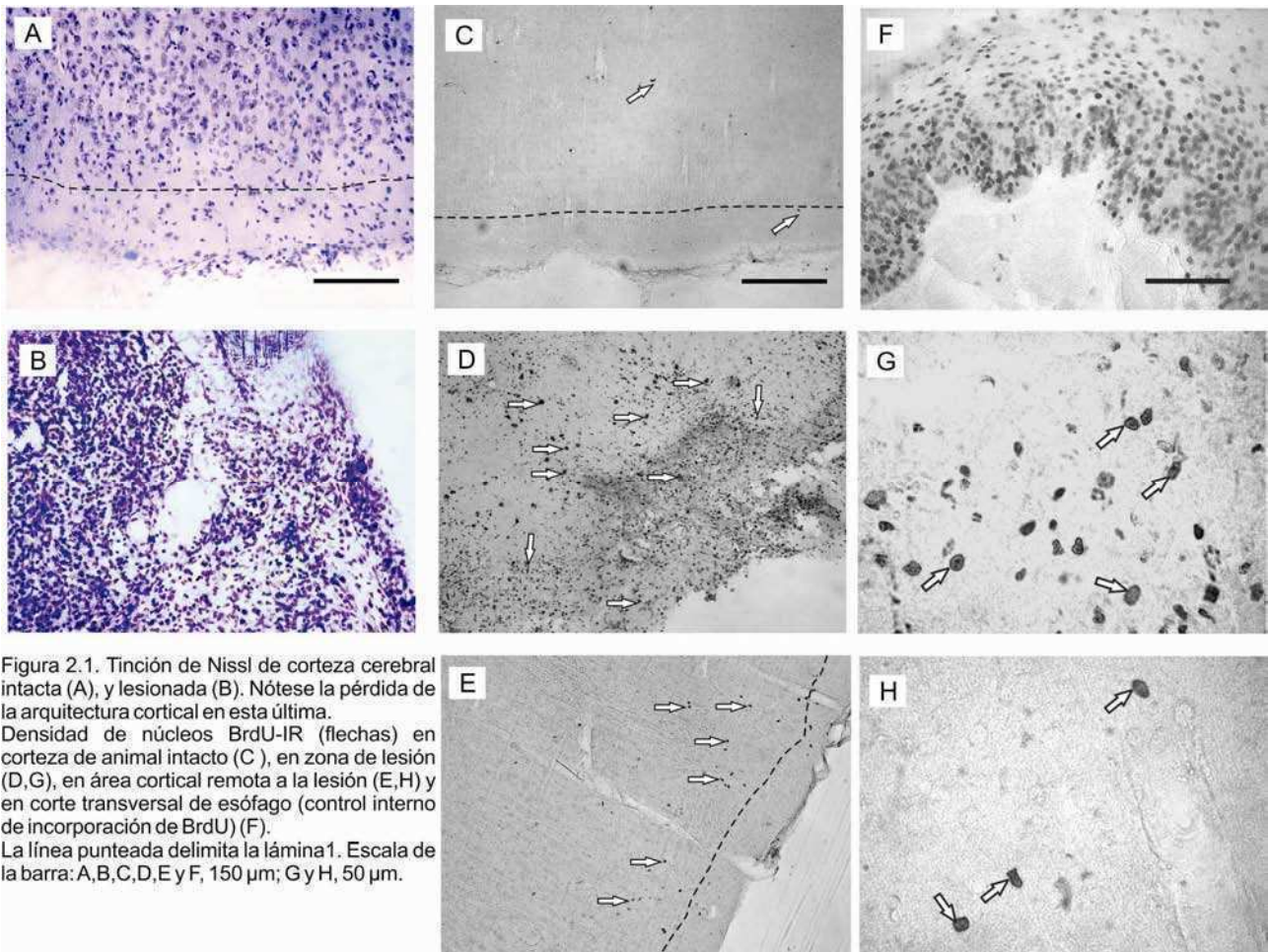


Tabla 2.1. Estadística descriptiva del conjunto de datos de la variable núcleos BrdU-IR/mm² obtenidos en los animales no operados (intactos).

INTACTOS					
	Percentilos	Mínimos sucesivos			
1%	0	0			
5%	0	0			
10%	0	0		N (campos)	1629
25%	0	0			
50%	1			Media	1,47
				DE	1,73
			Máximos sucesivos		
75%	2	11		Varianza	3,00
90%	4	12			
95%	5	13			
99%	8	13			

En los animales operados, se observó una densidad de BrdU significativa en la zona de lesión y en áreas corticales remotas (Fig. 2.1). La lesión quirúrgica de la **corteza prefrontal** indujo un aumento local de la densidad de núcleos BrdU-IR, la cual disminuyó con la distancia desde la herida a lo largo de la corteza ipsilateral, en el eje rostro-caudal (Fig. 2.2; 2.3; 2.4; 2.5; ver también tabla 2.5 más adelante). La estadística descriptiva se muestra en la Tabla 2.2. El aumento de la densidad de BrdU-IR fue más manifiesto en las láminas corticales supragranulares (ver fig. 2.1E). Áreas corticales frontales distantes, ipsilaterales, tales como el *giro frontal inferior (gfi)* y el *giro precentral (gpc)* presentan una mayor densidad de núcleos BrdU-IR que en el caso de los animales controles. Lo mismo sucede en el *giro parietal anterior (gpa)* y el *giro angular (ga)* de la corteza parietal posterior ipsilateral.

Tabla 2.2. Estadística descriptiva del conjunto de datos de la variable núcleos BrdU-IR/mm² obtenidos en los animales lesionados en corteza prefrontal.

LESIONADOS en corteza prefrontal

	Percentilos	Mínimos sucesivos		
1%	0	0	N (campos)	4659
5%	0	0		
10%	0	0		
25%	2	0		
50%	5		Media	27,16
		Máximos sucesivos	DE	90,29
75%	17	1276	Varianza	8152,22
90%	45	1350		
95%	112	1399		
99%	455	1437		

Cebus (82)-lesión Prefrontal

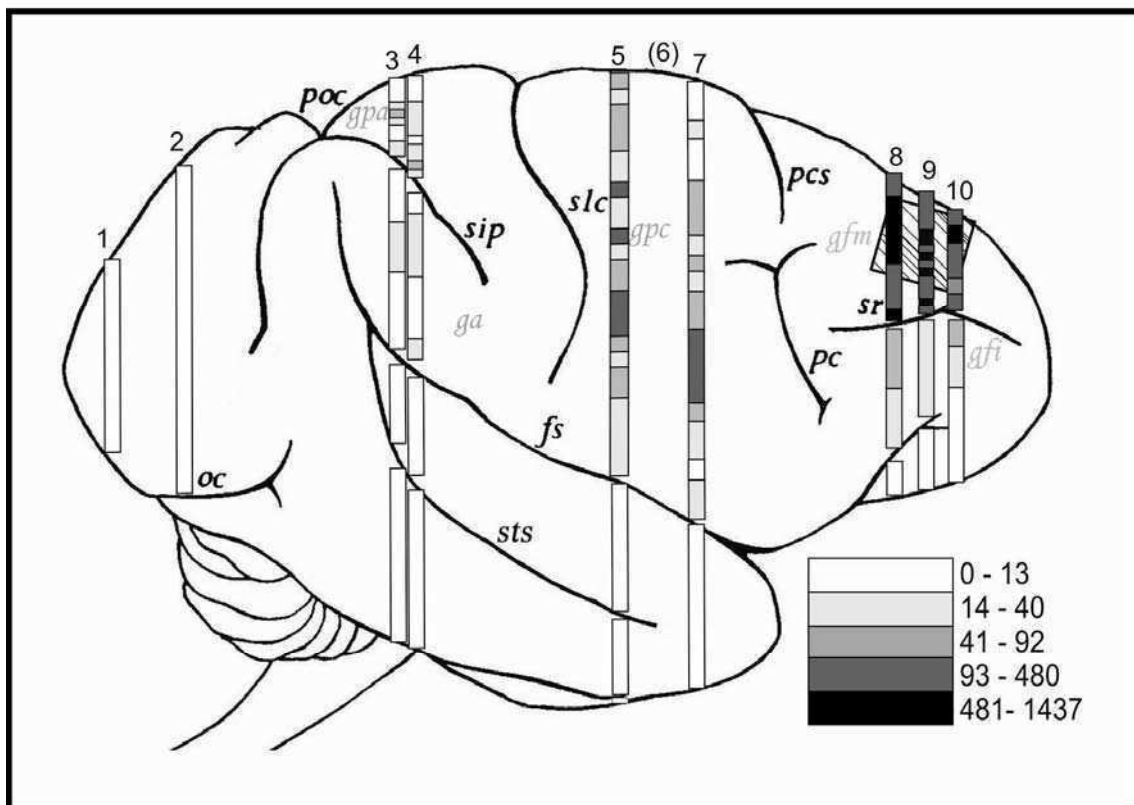


Figura 2.2. Distribución cortical de núcleos BrdU-IR/mm² en las láminas corticales supragranulares del Cebus(82), luego de una lesión en corteza prefrontal derecha. Se muestra como esquema de densidad en escala de grises de un corte representativo por perfil. Los números indican el perfil analizado en cada área cortical.

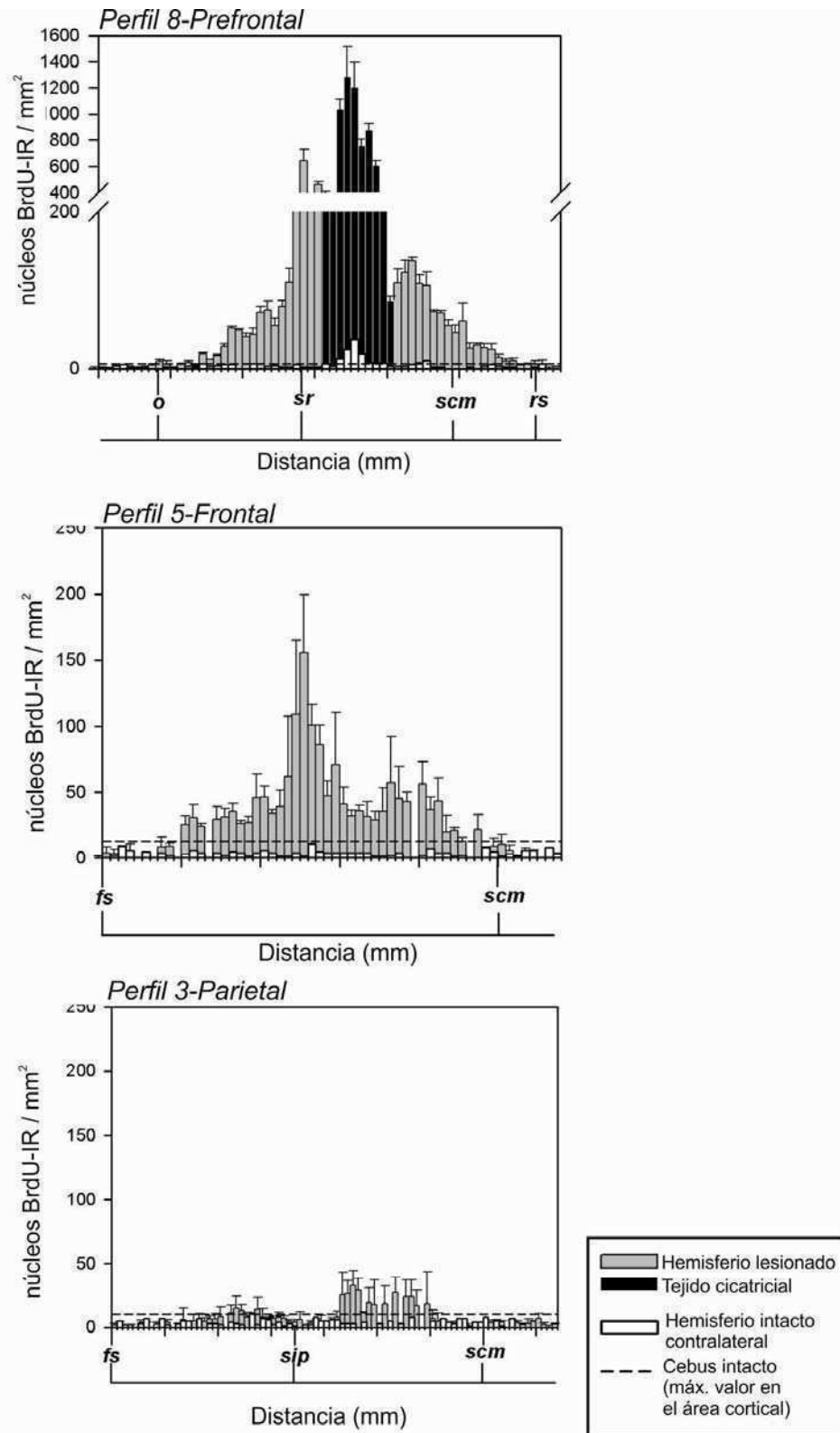


Figura 2.3. Distribución cortical de núcleos BrdU-IR/mm² en las láminas corticales supragranulares del Cebus(82), luego de una lesión en corteza prefrontal derecha. Se muestra la densidad de núcleos BrdU-IR/mm² en cada campo analizado a lo largo del perímetro cortical. Se grafican los valores como media \pm DE, de 3 cortes por perfil. Se muestra sólo un perfil por área cortical, como ejemplo. En el eje x, los intervalos de distancia son de 1 mm (tamaño de los campos de conteo), y se muestra la ubicación de los surcos corticales como referencia.

Cebus (113)-lesión Prefrontal

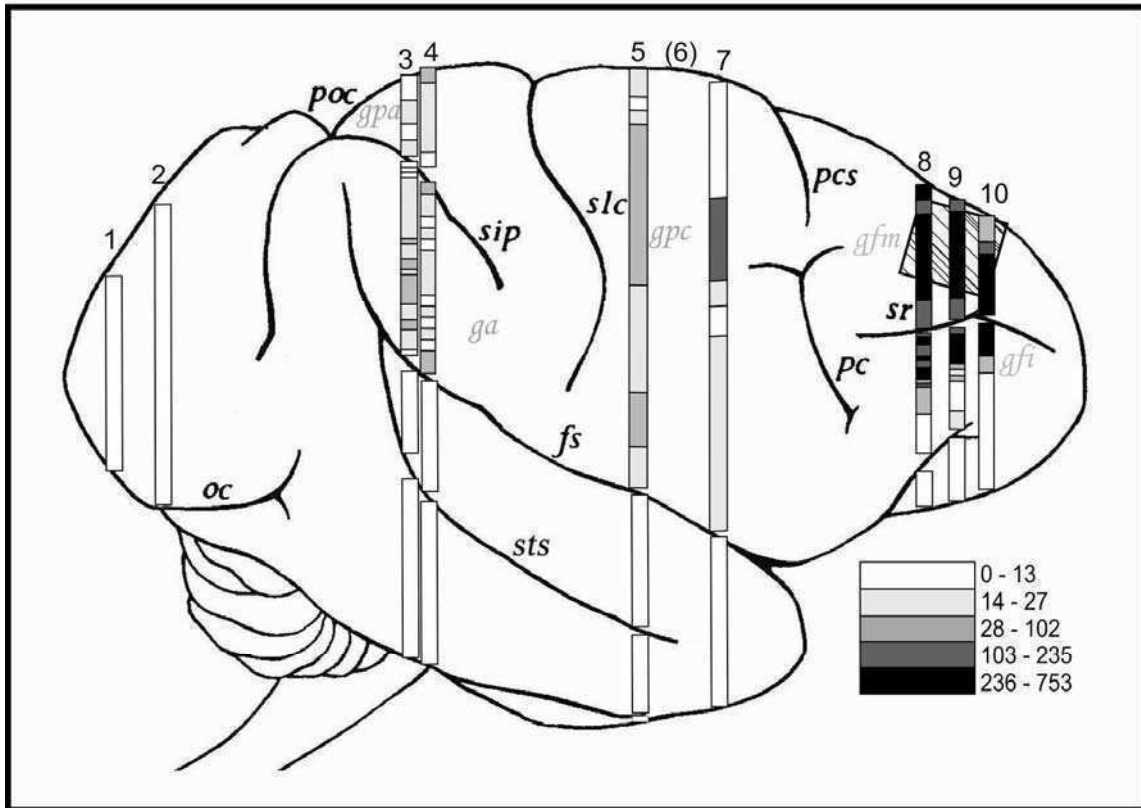


Figura 2.4. Distribución cortical de núcleos BrdU-IR/mm² en las láminas corticales supragranulares del Cebus(113), luego de una lesión en corteza prefrontal derecha. Se muestra como un esquema de densidad en escala de grises de un corte representativo por perfil. Los números indican el perfil analizado en cada área cortical.

Sólo en uno de los monos lesionados en la corteza prefrontal, en las zonas corticales cercanas al *giro fronto medial* (*gfm*) del hemisferio contralateral –que topográficamente coincide con la zona de lesión–, se observó una densidad de núcleos BrdU-IR que supera los niveles basales hallados en los monos controles intactos. Ningún efecto fue evidente en las cortezas occipital y temporal, de ambos hemisferios (Fig. 2.3; 2.5).

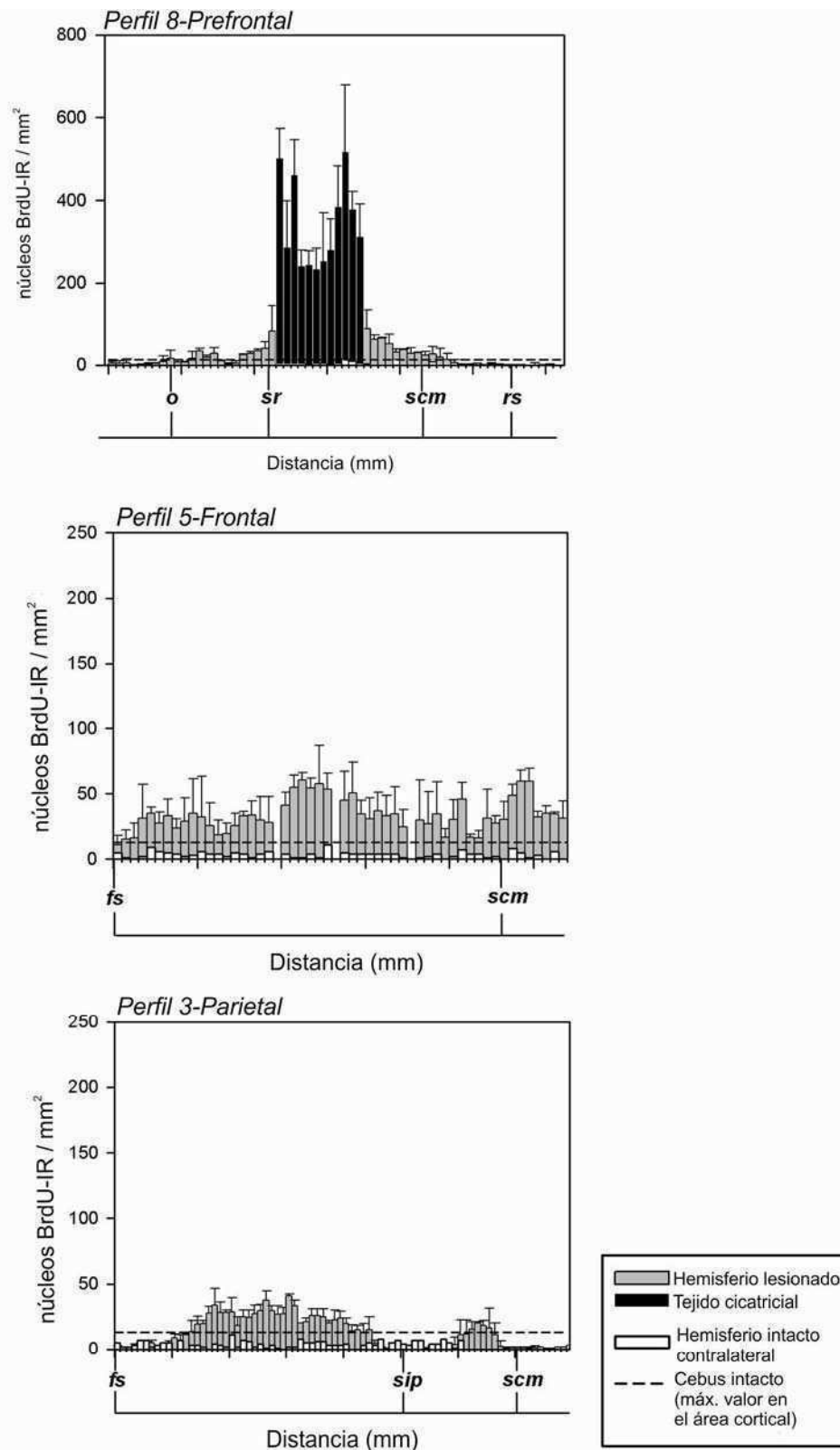


Figura 2.5. Distribución cortical de núcleos BrdU-IR/mm² en las láminas corticales supragranulares del Cebus(113), luego de una lesión en corteza prefrontal derecha. Se muestra la densidad de núcleos BrdU-IR/mm² en cada campo analizado a lo largo del perímetro cortical. Se grafican los valores como media \pm DE, de 3 cortes sucesivos por perfil. Se muestra sólo un perfil por área cortical, como ejemplo. En el eje x, los intervalos de distancia son de 1 mm (tamaño de los campos de conteo), y se muestra la ubicación de los surcos corticales como referencia.

La lesión quirúrgica de la **corteza estriada** indujo un aumento local de densidad de núcleos BrdU-IR dentro de la lesión, y en la corteza estriada contigua ipsilateral (Fig. 2.6; 2.7; 2.8; 2.9). La estadística descriptiva se muestra en la Tabla 2.3. La marcación en sitios remotos a la lesión, se observó en las láminas supragranulares de la corteza temporal ipsilateral, en el *giro temporal superior (gts)* y el *giro temporal medio (gtm)*, así como en las cortezas frontal (*gpc*) y parietal (*gpa* y *ga*). La corteza contralateral mostró una marcación de núcleos BrdU-IR homogénea a niveles basales (ver gráficos de ejes en Figuras 2.7 y 2.9).

Tabla 2.3. Estadística descriptiva del conjunto de datos de la variable núcleos BrdU-IR/mm² obtenidos en los animales lesionados en corteza estriada.

LESIONADOS en corteza estriada					
	Percentilos	Mínimos sucesivos			
1%	0	0			
5%	0	0			
10%	1	0		N (campos)	5544
25%	5	0			
50%	17			Media	28,86
				DE	47,53
			Máximos sucesivos		
75%	39	601		Varianza	2259,42
90%	63	619			
95%	82	767			
99%	233	812			

En cuanto a la naturaleza de la incorporación nuclear de BrdU en áreas corticales remotas a la lesión, cabe señalar que la mayoría de los núcleos BrdU-IR también expresaron Ki-67, lo que sugiere que la incorporación de BrdU se debió a la replicación del ADN y no a su reparación (Fig. 2.10; Tabla 2.4). Se analizaron cortes representativos de la corteza parietal de los animales lesionados, dado que fue el área cortical remota

dónde se halló la respuesta de incorporación de BrdU tanto en los monos lesionados en corteza prefrontal como en los lesionados en corteza estriada.

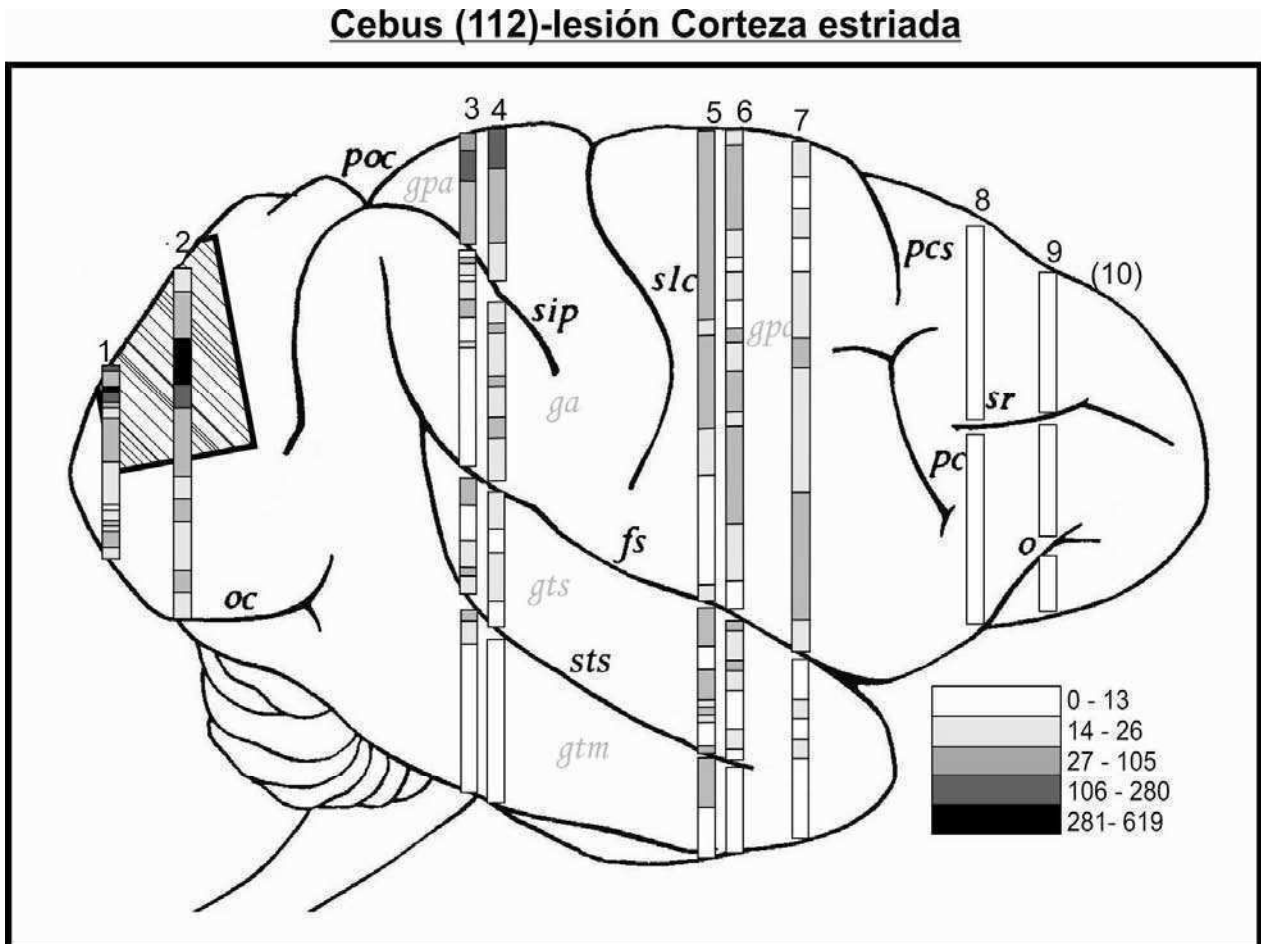


Figura 2.6. Distribución cortical de núcleos BrdU-IR/mm² en las láminas corticales supragranulares del Cebus(112), luego de una lesión en corteza estriada derecha. Se muestra como esquema de densidad en escala de grises de un corte representativo por perfil. Los números indican el perfil analizado en cada área cortical.

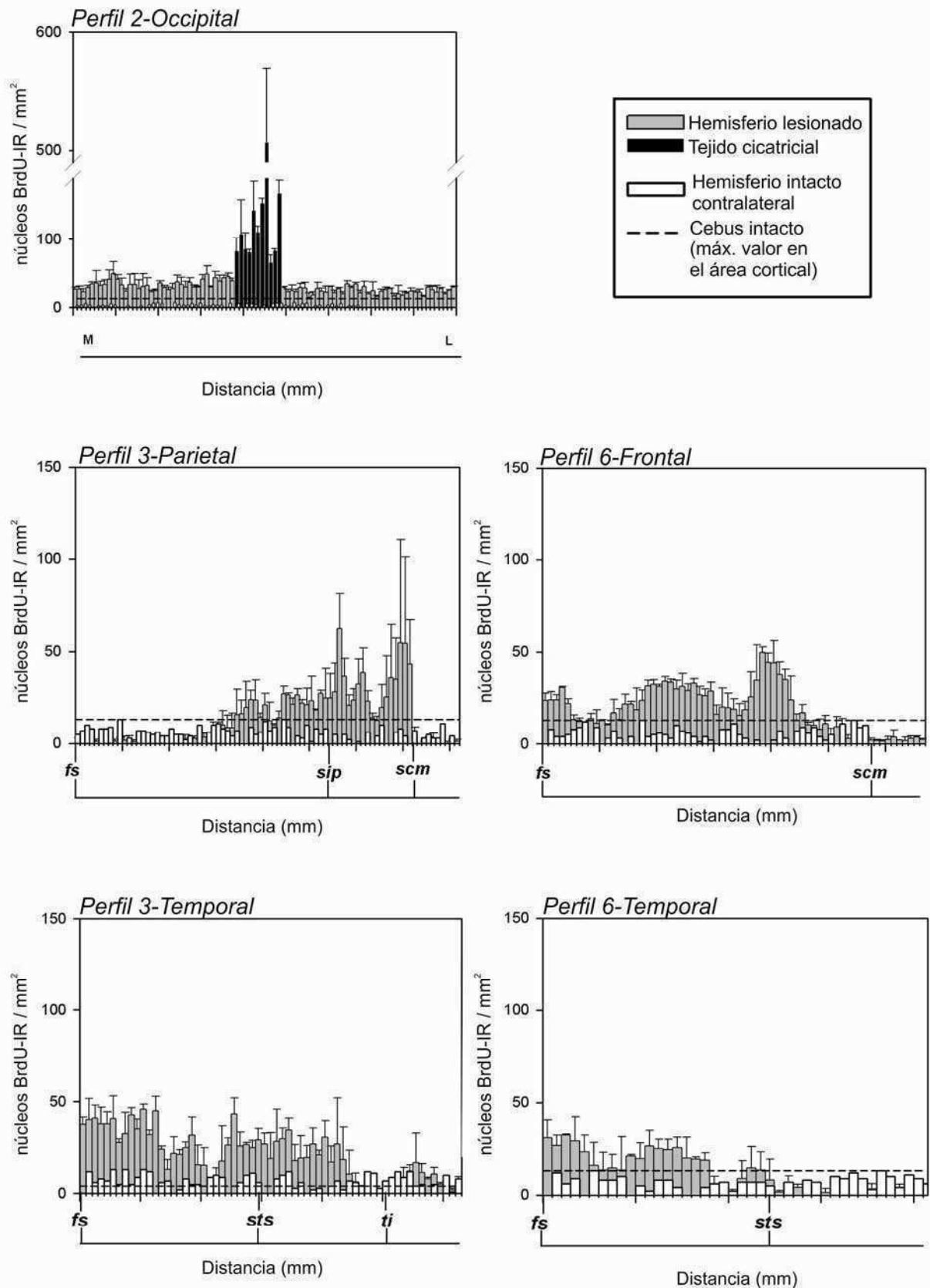


Figura 2.7. Distribución cortical de núcleos BrdU-IR/mm² en las láminas corticales supragranulares del Cebus(112), luego de una lesión en corteza estriada derecha. Se muestra la densidad de núcleos BrdU-IR/mm² en cada campo analizado a lo largo del perímetro cortical. Se grafican los valores como media \pm DE, de 3 cortes sucesivos por perfil. Se muestra sólo un perfil por área cortical, como ejemplo. En el eje x, los intervalos de distancia son de 1 mm (tamaño de los campos de conteo), y se muestra la ubicación de los surcos corticales como referencia. M: medial. L: lateral.

Cebus (80)-lesión Corteza estriada

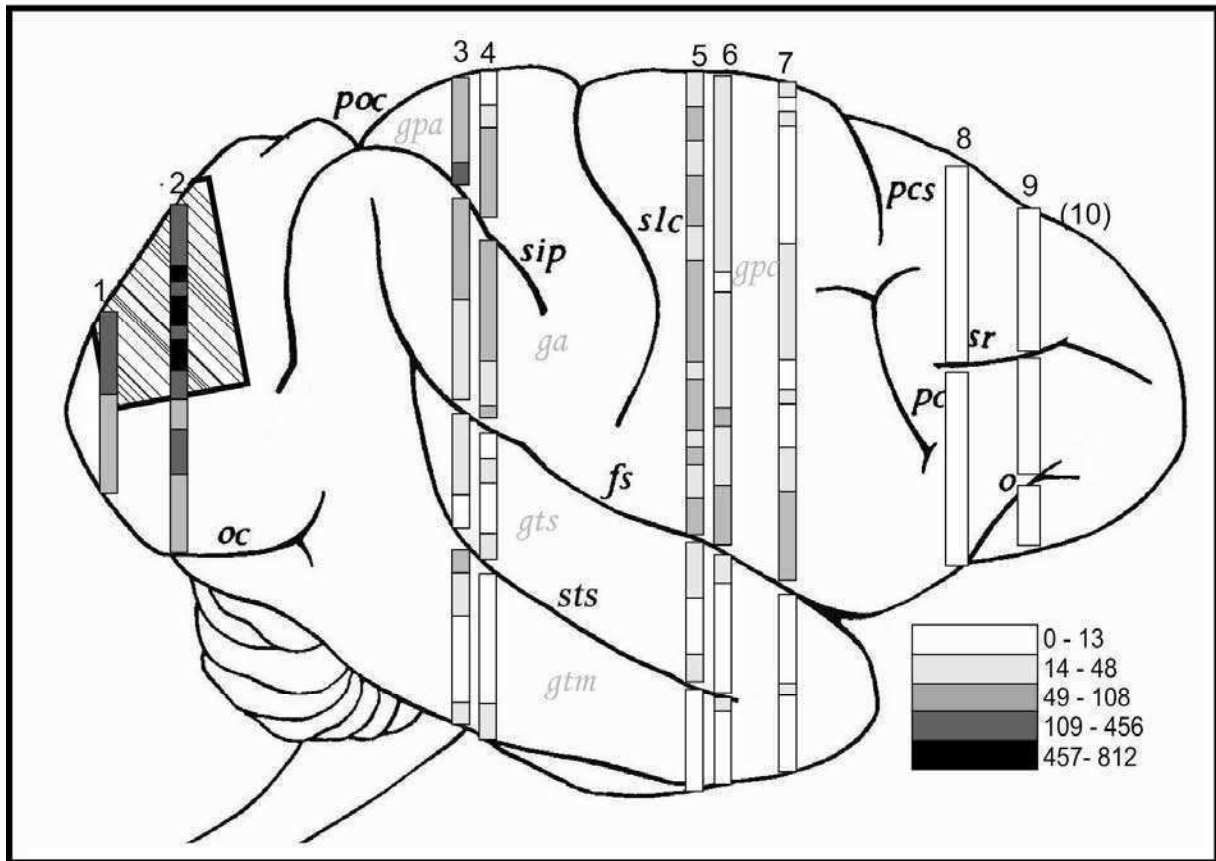


Figura 2.8. Distribución cortical de núcleos BrdU-IR/mm² en las láminas corticales supragranulares del Cebus(80), luego de una lesión en corteza estriada derecha. Se muestra como esquema de densidad en escala de grises de un corte representativo por perfil. Los números indican el perfil analizado en cada área cortical.

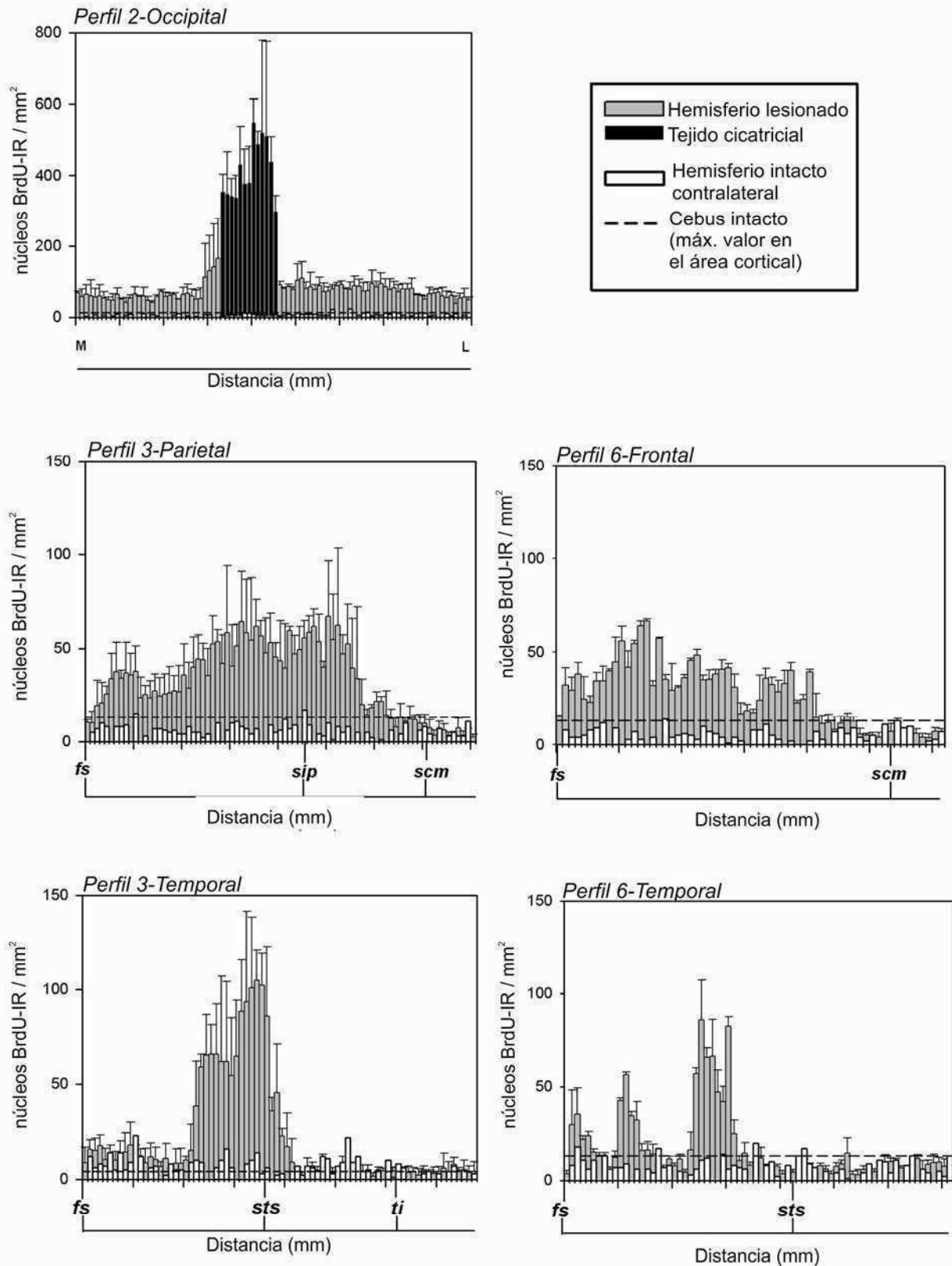


Figura 2.9. Distribución cortical de núcleos BrdU-IR/mm² en las láminas corticales supragranulares del Cebus(80), luego de una lesión en corteza estriada derecha. Se muestra la densidad de núcleos BrdU-IR/mm² en cada campo analizado a lo largo del perímetro cortical. Se grafican los valores como media \pm DE, de 3 cortes sucesivos por perfil. Se muestra sólo un perfil por área cortical, como ejemplo. En el eje x, los intervalos de distancia son de 1 mm (tamaño de los campos de conteo), y se muestra la ubicación de los surcos corticales como referencia. M: medial. L: lateral.

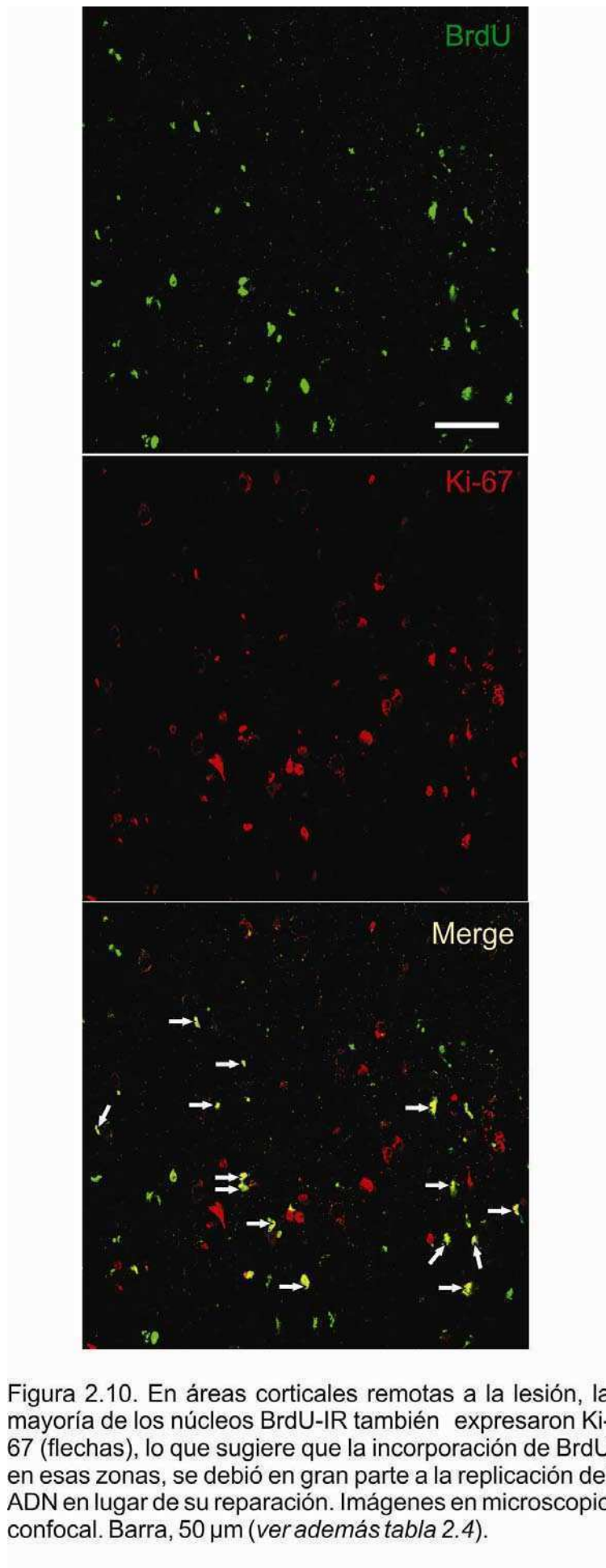


Figura 2.10. En áreas corticales remotas a la lesión, la mayoría de los núcleos BrdU-IR también expresaron Ki-67 (flechas), lo que sugiere que la incorporación de BrdU en esas zonas, se debió en gran parte a la replicación del ADN en lugar de su reparación. Imágenes en microscopio confocal. Barra, 50 μ m (ver además tabla 2.4).

Tabla 2.4. Estadística descriptiva del porcentaje de núcleos doblemente marcados para BrdU/Ki67, respecto al total de núcleos marcados con BrdU, en sitios corticales remotos al área de la lesión (corteza parietal). Los valores (*) expresan la media entre 3 cortes. DE: desvío estándar; EE: error estándar.

CEBUS	% Núcleos *	DE	EE
80	48,18	18,18	6,06
82	66,15	17,41	5,80
112	64,51	12,78	4,26
113	79,53	8,20	2,73

Además de la no homogeneidad de las varianzas en el conjunto de datos de densidad cortical de los núcleos BrdU-IR (*Levene*, $W0 = 205.13397 \gg F = 2.640e-88$), éstas resultaron muy altas en los monos lesionados y superaron en gran medida a las medias muestrales (ver las tablas 2.2 y 2.3). Debido a esta característica del grupo de datos, se realizó un análisis utilizando el *modelo de regresión binomial negativa*, para evaluar si los resultados pueden ser explicados por el efecto de la lesión, teniendo en cuenta la variabilidad entre áreas corticales y entre monos (es decir, ajustando el modelo para efectos de no-independencia dentro de clusters área+mono). Dado que ambas condiciones de lesión difieren muy significativamente de la condición de animal intacto ($p < 0,001$, en ambos casos), los resultados de aumento de densidad de núcleos BrdU-IR en la áreas implicadas (Figuras 2.2-2.9) pueden explicarse por un efecto de la lesión, independientemente de su ubicación (corteza estriada o prefrontal). Por otra parte, los valores similares de los coeficientes de regresión (C. estriada= $2,97 \pm 0,62$; C. prefrontal= $2,91 \pm 0,90$; valores mostrados como $\text{media} \pm 2 \cdot \text{EEM}$) sugieren que el efecto es similar cuando la lesión se realiza en cualquiera de las dos áreas corticales. De hecho, hay superposición de los intervalos de confianza de ambos coeficientes.

En los cerebros de *Cebus* intactos la densidad de núcleos BrdU-IR fue homogénea en todas las áreas corticales. La lesión –ya sea en la corteza estriada o en la prefrontal– indujo un aumento local de la densidad de núcleos BrdU-IR que pareciera disminuir con la distancia desde la herida a lo largo de la corteza ipsilateral hacia otras áreas en el eje

rostro-caudal. Esta observación se ve reflejada en los valores de la media y de la mediana, de la distribución de los valores de densidad de núcleos BrdU-IR en las distintas áreas corticales y en los *perfiles* analizados en esas áreas (Tablas 2.5; 2.6. Ver también Figuras 2.2-2.9).

Tabla 2.5. Media (m), desvío estándar (DE), y mediana (P50) de la distribución de núcleos BrdU-IR/mm² en las áreas corticales de los cebus, intactos (I), lesionados en corteza estriada (CE) y en corteza prefrontal (CP).

Condición		Occ	Parietal	Temporal	Frontal	PreFr
I	m	1,05	1,94	1,14	2,27	1,27
	DE	1,12	2,12	1,49	2,05	1,67
	P50	1	1	1	2	1
CE	m	68,52	27,23	17,55	22,33	3,77
	DE	85,54	25,23	20,92	20,03	3,09
	P50	48	20	10	17	3
CP	m	3,58	11,69	2,89	31,39	84,92
	DE	2,87	11,27	2,73	57,49	170,03
	P50	3	8	2	22	19,50

Para evaluar si la respuesta a la lesión sistemáticamente decrece desde el sitio de lesión, y reconfirmar esta evidencia sugerida por los resultados, se realizó una *prueba estadística de Tendencia* usando los **perfiles** como los grupos ordenados de datos. La prueba evalúa si hay tendencia a través de los *perfiles*, desde los situados en el área cortical que contiene la zona de lesión, hacia los situados en las otras áreas distantes, y si es una tendencia positiva (aumento de la respuesta) o negativa (disminución de la respuesta).

El análisis confirma que en los *Cebus* intactos la tendencia no es significativa ($p= 0,78$), y en los *Cebus* lesionados, la **tendencia negativa** es muy significativa ($p<0,01$), sugiriendo una disminución de la densidad de núcleos BrdU-IR a través de los perfiles, desde la zona de lesión hacia las áreas corticales remotas.

Tabla 2.6. Media (m), desvío estándar (DE), y mediana (P50) de la distribución de núcleos BrdU-IR/mm² en los **perfiles** analizados, en las áreas corticales de los cebus, intactos (I), lesionados en corteza estriada (CE) y en corteza prefrontal (CP).

Condición	PERFIL										
	(Caudal)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	(Rostral)
I	m	----	1,05	----	1,53	2,27	----	----	----	----	1,27
	DE	----	1,12	----	1,87	2,05	----	----	----	----	1,67
	P50	----	1	----	1	2	----	----	----	----	1
CE	m	55,03	79,24	21,73	26,21	24,51	18,58	13,78	3,79	3,75	----
	DE	57,08	101,47	23,40	26,99	22,28	16,76	15,68	3,14	3,02	----
	P50	41	52	15	17	20	13	8	3	3	----
CP	m	3	3,95	7,63	8,68	19,39	----	17,89	107,55	83,01	53,64
	DE	2,89	2,79	9,27	10,60	24,54	----	59,61	219,31	146,31	99,28
	P50	2	3	4	4	8	----	5	27	19	14

*no fueron analizados estos perfiles.

Inmuno-caracterización de las células corticales proliferantes

Como se esperaba, en las zonas de lesión y perilesional de los animales lesionados, se hallaron astrocitos y microglia/macrófagos con características reactivas. La astroglía GFAP-IR tenía las típicas características morfológicas reactivas, como ser mayor inmunoreactividad a GFAP, y engrosamiento del soma y procesos celulares. Además, se hallaron células vimentina-IR dentro de la lesión y en la zona perilesional. En este último caso, la densidad de células vimentina-IR se redujo progresivamente desde el límite de la cicatriz, así como también el engrosamiento relativo sus procesos (Figura 2.10).

Las células IsolectinaB4+ presentaron morfología microglial reactiva, aparentemente en estadíos 1, 2 y 3. Además, se halló esta marca asociada a vasos corticales (Fig. 2.11).

Por otra parte, en cuanto a la "identidad celular" de los núcleos BrdU-IR, no se encontró coincidencia entre la marcación de éstos con GFAP, Glutamino sintetasa, o vimentina, ni en el sitio de lesión ni en la zona perilesional. En las regiones corticales remotas al sitio de lesión primario, no se encontraron células GFAP-IR con morfología reactiva (Figura 2.10.), ni células vimentina-IR.

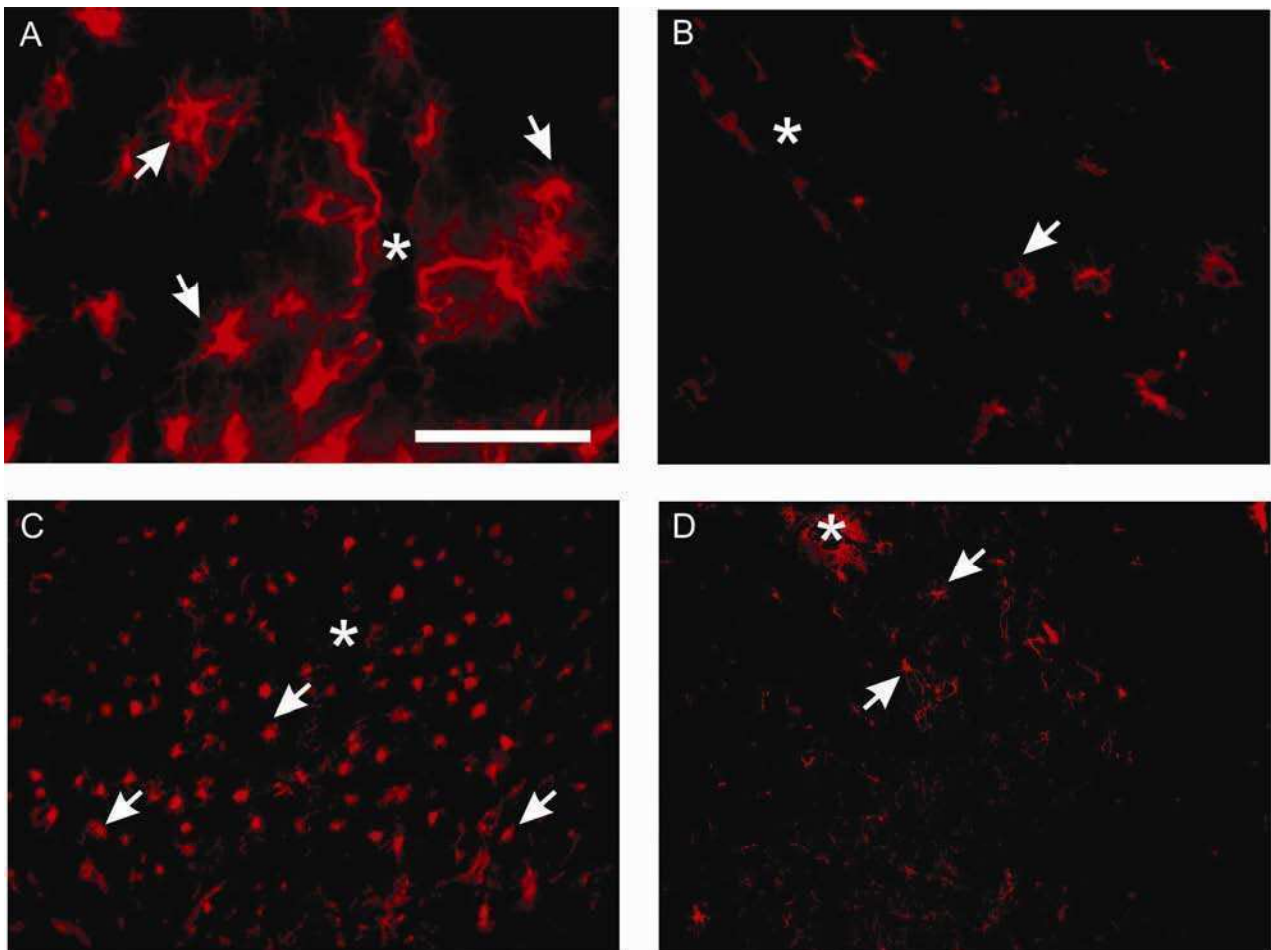


Figura 2.11. Marcación de Vimentina y GFAP. En zona de lesión (A,C, respectivamente), Vimentina perilesional (B) y GFAP en áreas corticales distantes (temporal; D). Nótese el engrosamiento de somas y procesos celulares en la zona de lesión. Esta característica reactiva no se encontró en áreas distantes. Las flechas indican células inmunoreactivas. * vaso capilar cortical. Escala de la barra, A, B= 85 μ m; C,D=250 μ m.

Sin embargo, algunos núcleos BrdU-IR de la zona lesionada y perilesional, coincidieron con la marcación de IsolectinaB4, lo que sugiere que estos núcleos podrían pertenecer a microglía en estadio 2 (proliferante) o 3 (macrofágica, que previamente fue de estadio 2, por lo que es BrdU-IR) (Figura 2.11). Por el contrario, en áreas corticales remotas no se encontró coincidencia de núcleos BrdU-IR con IsolectinaB4.

Por otra parte, neuronas NeuN-IR no coincidieron con los núcleos BrdU-IR, ni en la lesión, ni en la zona perilesional, ni en zonas corticales remotas. Asimismo, en los monos lesionados no se hallaron células dobles inmunoreactivas para BrdU/NeuN en zona subventricular del tercer ventrículo ni de los ventrículos laterales. No se encontraron núcleos BrdU-IR en estructuras hipocámpicas, como *fascia dentata* y giro dentado.

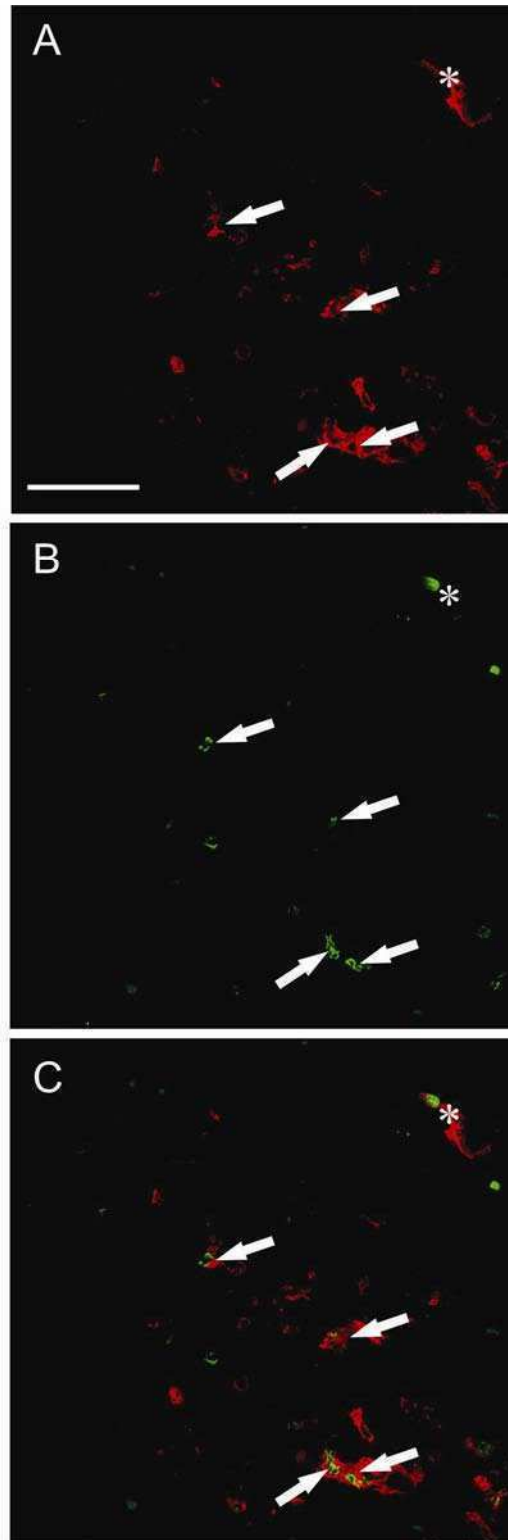


Figura 2.12. Imágenes de microscopía confocal para marcación Ib4 (A), BrdU (B) y doble marcación (C). Flechas: células marcadas. * Vasos marcados. Escala de la barra para A, B y C, 50 μm

Es bien sabido que las células que expresan NG2 muestran cambios reactivos después de lesiones, incluyendo la incorporación de BrdU. En nuestro estudio, la

posibilidad de que esos núcleos BrdU-IR en sitios corticales remotos correspondan a células NG2 fue considerada pero no se obtuvo éxito en la inmunomarcación en el tejido de mono - incluso fijado en períodos más cortos, es decir, 3 horas - probando varios anticuerpos, que incluyeron varios de origen comercial (ver **Metodología** para la descripción) y otros amablemente cedidos por el profesor William Stallcup (Sanford-Burnham, Instituto de investigaciones médicas, La Jolla, USA). Sin embargo, logramos una muy buena marcación, en cerebros de rata con una fijación leve de 2hs. postperfusión (Fig. 2.12)

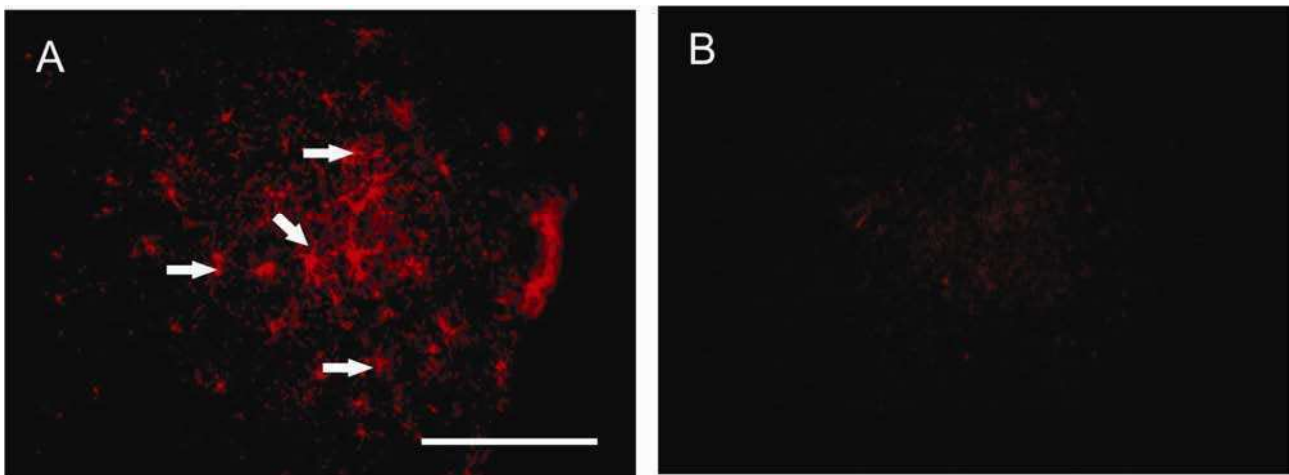


Figura 2.13. Ejemplo de inmunomarcación obtenida con anticuerpos anti-NG2 en cortes de cerebro de rata fijado por 2hs postperfusión. (A) Células NG2 (flechas) en corteza cerebral. (B) Control negativo de la inmunomarcación evitando el anticuerpo 1ro. Escala de la barra A y B, 200 μ m.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio, proporcionan la base para algunas propuestas interesantes con respecto a los efectos celulares proximales y remotos subsiguientes a una lesión quirúrgica programada, situada en las cortezas prefrontal o estriada de primates adultos.

La inmunoreactividad nuclear de BrdU sugiere células en ciclo/proliferantes

Presuntas células proliferantes fueron identificadas por marcación con BrdU, que es un análogo de la timidina que se incorpora al ADN nuevo formado durante la replicación, en la fase “S” del ciclo celular, en las células que están ciclando y, que con la progresión del ciclo celular, entraran en mitosis (Franke y cols., 1999; Környei y cols., 2000; Kee y cols., 2002).

Como ha señalado Rakic (2002), la molécula de BrdU puede incorporarse en el núcleo celular asimismo, durante procesos de reparación del ADN dañado. Bajo este supuesto, la incorporación de BrdU en los casos presentados en este capítulo de la Tesis, podrían no necesariamente estar vinculados con la replicación del ADN –asociada a la proliferación celular-, sino que tal vez, con su reparación. Este proceso podría inducirse por el daño al ADN como consecuencia de procesos postlesionales, secundarios, debido a la transección de fibras cortico-corticales. Sin embargo, en este caso, esta última posibilidad parece ser poco probable, por los motivos que se exponen a continuación.

El principal fundamento que se considera, es que la mayoría de los núcleos BrdU-IR observados en este estudio, también expresaron Ki-67, un marcador endógeno de células en ciclo celular. Si bien se encontró cierta variabilidad en este sentido, alrededor de un 60% de los núcleos BrdU-IR, también eran Ki-67-IR. Tal resultado sugiere que la incorporación de BrdU en este estudio, se debió a la replicación del ADN y no a su reparación. El porcentaje restante de núcleos BrdU-IR que no coincidió con Ki-67, podría tratarse de células que ya no estaban ciclando en el momento de finalización del experimento (perfusión de los animales), es decir, 3 días después de la última inyección de BrdU. Por lo tanto, es probable que los núcleos no doblemente marcados correspondan a aquellos que incorporaron BrdU en las inyecciones anteriores (días 2 y 5 posteriores a la cirugía), y que estas células ya no estén ciclando al día 12, cuando finalizó el experimento. Cabe mencionar además, que se encontraron núcleos Ki-67-IR,

que no estaban asociados a marca de BrdU (ver el *merge* en la figura 2.10), por lo que el meuropilo de aquellos sitios distantes muestra signos de células ciclando al menos hasta los 12 días posteriores a la lesión. Estudios complementarios serían necesarios para profundizar este aspecto.

Por otra parte, el uso de la captación de BrdU para marcar células ciclando con potencial proliferativo parece estar bien establecido (Campana y cols., 1988; Kee y cols., 2002; entre otros). Sin embargo, otros investigadores usan BrdU para ensayos de detección de reparación del ADN (Kalle y cols., 1993; Selden y cols., 1993; Balajee y cols., 1998). Vale la pena mencionar que existe diferencia entre ambos patrones de marcación, ya sea BrdU incorporado por replicación de ADN, ya sea por su reparación. Mientras una marcación de BrdU nuclear fuerte y difusa –como se observó en el presente estudio–, se ha asociado a células en fase S, una marcación en puntos discretos ('spots'), estaría vinculada a los parches de reparación del ADN (Kao y cols., 2001; Solomon y cols., 2004). De hecho, dado que la incorporación de BrdU en los parches de reparación parece ser muy baja, el uso de BrdU en los ensayos de incorporación de nucleótidos con el objetivo de estudiar el proceso de reparación de ADN, ha sido cuestionado (véase, por ejemplo, Limsirichaikul y cols., 2009). Por otra parte, se sostiene que la cantidad de BrdU que se incorporaría *in vivo* en el proceso de reparación del ADN, está por debajo del nivel de detección inmunohistoquímica de los procedimientos habituales (Bauer y Patterson, 2005; Moore y cols., 2002.). En consecuencia, la dosis habitual de BrdU para detectar las células en ciclo/ proliferantes - tres inyecciones i.p. de 80 mg / kg, tal como se utiliza en el presente estudio–, parece no ser suficiente para detectar BrdU incorporado en procesos de reparación del ADN.

Por las razones expuestas, se sostiene que la inmunoreactividad de BrdU detectada en los presentes casos estudiados, es de núcleos pertenecientes a células en fase S del ciclo celular y potencialmente proliferantes, en lugar de a células en proceso de

reparación de su ADN. Tal resultado, da indicios de que la reacción postlesional en estos sitios remotos al foco de la lesión, podría implicar la generación de células nuevas, involucradas en una respuesta reactiva y/o regenerativa. Otros estudios serían necesarios para discernir entre ambas posibilidades.

Distribución cortical de la respuesta de proliferación

La distribución cortical de la respuesta de proliferación -incorporación nuclear de BrdU- fue claramente diferente dependiendo de la ubicación de la lesión cortical. Tras la lesión prefrontal, se observó BrdU-IR dentro de la región frontal y en sitios parietales. La lesión en corteza estriada produjo un efecto similar a la anterior, pero extendido también a regiones corticales temporales. En ambos casos, la mayor densidad de núcleos BrdU-IR observados en sitios remotos a la lesión, se encontró en las láminas supragranulares. Esta densidad de núcleos BrdU-IR aumentada respecto al basal en los sitios corticales remotos, tras ambos tipos de lesión -prefrontal u occipital-, podría depender de tres posibles circunstancias, ya que pueden estar asociados con el compromiso de i) las conexiones cortico-corticales, ii) los vasos sanguíneos lindantes y ii) el “ sincicio glial”.

Las conexiones cortico-corticales ipsilaterales han sido descritas por diversos autores (véase por ejemplo, Rockland y Pandya, 1979; Schwartz y Goldman-Rakic, 1982) y la mayor parte implica a las láminas supragranulares. Una variedad de fibras de proyección callosas tendrían impacto en diferentes sitios corticales y subcorticales.

Considerando el mapa citoarquitectónico de Brodmann de áreas corticales en *Macaca* (Brodmann, 1909), la zona de la lesión prefrontal realizada en los monos *Cebus apella*, incluyó partes de las áreas 6 y 9, es decir, corteza premotora y corteza dorsolateral prefrontal, respectivamente. Cabe señalar que -a la observación clínica- transcurridas las primeras 48 horas, los animales no mostraron signos de afectación motora grosera, ni evidencia de limitación en su autosuficiencia. Las áreas frontales ipsilaterales distantes

donde se observó una elevada densidad de núcleos BrdU-IR, incluyeron partes de la corteza motora primaria. Las conocidas interconexiones estructurales (axonales) existentes entre estas regiones corticales frontales, sugieren que podrían ser parte del origen de la respuesta de incorporación nuclear de BrdU observada, que ocurre después de una lesión prefrontal.

La incorporación de BrdU sobre los niveles basales también ocurrió en la corteza parietal posterior ipsilateral (áreas 5 y 7 de Brodmann, que corresponden a la corteza somatosensorial asociativa en monos macaca). De hecho, se ha demostrado en los monos *macaca* que la corteza prefrontal está conectada recíprocamente con otras regiones de la neocorteza, que incluyen áreas de asociación de la corteza parietal posterior (Schwartz y Goldman-Rakic, 1982), lo que podría explicar la respuesta de incorporación de BrdU observada en esas áreas. Procedimientos de análisis más finos –comportamentales o neurofisiológicos– probablemente hubieran reflejado alguna correlación con estas modificaciones, que no se vislumbraron a la observación clínica.

La lesión de la corteza estriada (visual) produjo un aumento de incorporación de BrdU nuclear que se “extendió” a diversas áreas corticales, reconocidas como áreas visuales secundarias y que, por lo tanto participan en el procesamiento de la información de la percepción visual y orientación del movimiento (Fiorani y cols., 1989; Bressler, 1996). Esas regiones afectadas incluyen la corteza temporal superior y medial (que en el cerebro de macaca incluiría áreas de Brodmann 20, 21, 22) y la corteza parietal posterior (áreas de Brodmann 5 y 7 de los monos macaca). Estas observaciones podrían estar asociadas a las descripciones hechas por Rockland y Pandya (1979) y Salin y Bullier (1995), en el trayecto de la información desde la corteza estriada hacia las áreas corticales sensoriales secundarias. En la corteza motora también la respuesta de proliferación fue importante, luego de la lesión en la corteza estriada.

Por lo tanto, la respuesta de incorporación nuclear de BrdU por encima de los

niveles basales, en áreas corticales distantes de una lesión focalizada -ya sea en corteza prefrontal o estriada- parece implicar áreas corticales funcionalmente interrelacionadas, más que ser el resultado de un efecto no específico o aleatorio. Además de que dicha respuesta involucró principalmente láminas corticales supragranulares -origen principal de las fibras cortico-corticales- la falta de una distribución difusa o aleatoria de los núcleos BrdU-IR, indicaría que las respuestas “remotas” no dependen de un compromiso vascular lindante sino, probablemente, de las conexiones neuronales señaladas. Aunque cabe mencionar, que la corteza en estrecha vecindad al sitio de lesión podría haber sido afectada por un daño secundario (isquemia) debido al compromiso vascular lindante.

El tercer mecanismo hipotético que podría estar involucrado en las respuestas “remotas” observadas, sería el ya caracterizado acoplamiento astrogial a través de uniones *gap*, que según algunos autores formaría una red funcional, de tipo sincicial (“sincicio panglial”). La respuesta local de esta *red* o *sincicio* astrogial a una lesión, ha sido analizada por varios autores (Bignami y Dahl, 1976; Balasingam y cols., 1994; Lin y cols., 1998, Roitbak y Syková, 1999). Mientras que el neuropilo cortical de las zonas perilesionales podría verse afectado por las señales que “viajan” desde el foco de lesión vía uniones *gap* de la *red* astrogial, el neuropilo de los sitios corticales más distantes (en miles de micrómetros) muy difícilmente estaría al alcance de este mecanismo. Según Roitbak y Syková (1999) la reactividad astrogial fue prominente en un área de aproximadamente 1 mm de ancho alrededor de la herida y disminuía a partir de ella. Además, Lin y cols. (1998) han analizado la participación de las uniones *gap* en la expansión de una lesión isquémica. Estos autores observaron que dos bloqueantes de uniones *gap* –octanol y halotano- administrados por vía sistémica, correlacionaban con una reducción del 30-60 % del volumen de infarto durante el derrame cerebral local. Por lo tanto, las pruebas citadas indican que el acoplamiento entre astrocitos mediado por uniones *gap* puede contribuir a la propagación de efectos celulares tras el trauma.

Por lo tanto, los núcleos BrdU-IR encontrados en áreas corticales distantes de la lesión focalizada, pueden pertenecer a un neuropilo que haya sido afectado por la interrupción, ya sea directa o transináptica, de las conexiones corticales (Matthews y Powell, 1960).

Inmunocaracterización de las células corticales proliferantes

Como se esperaba, no sólo en la lesión, sino también en las zonas perilesionales, se hallaron astrocitos GFAP-IR tanto en los monos lesionados en la corteza prefrontal como en la corteza estriada. Estas células tenían las conocidas características morfológicas típicas de astrocitos reactivos como fue descrito anteriormente por ENG y cols. (1971), Bignami y Dahl (1976), Nathaniel y Nathaniel (1981), Colombo y cols. (1997a), entre otros. Sin embargo, estas células GFAP-IR no coincidieron con los núcleos BrdU-IR, ni en la zona de lesión ni en zonas perilesionales. Esto implicaría que estas células GFAP-IR no estaban en división celular, sino que posiblemente fueran células en migración (ENG y Ghirnikar, 1994). De hecho, la cuestión de que los astrocitos GFAP-IR se dividan tras una lesión del SNC no está claramente establecida, existiendo controversias entre diversos estudios, donde en la mayoría de ellos no se encontró proliferación astrogliar (véase Norton y cols., 1992), lo cual concuerda con el concepto de que una célula ya diferenciada y madura en general no experimenta mitosis. Varios investigadores han sugerido que hay relativamente pocos astrocitos proliferantes y que el aumento aparente de astrocitos reactivos se debe principalmente a la migración de las células cercanas, o a la adquisición postlesional de GFAP-IR en células residentes, ya sea por aumento de la expresión de GFAP o mayor disponibilidad de los epitopes de esta molécula frente a la detección con un anticuerpo específico (Miyake y cols., 1992; Amat y cols., 1996).

Por otra parte, se observaron abundantes células vimentina-IR dentro y en la

periferia de la lesión. Como es sabido, la expresión de vimentina por la astroglia se observa durante las etapas iniciales del desarrollo, en glía radial y su transformación temprana a astrocitos, y en células gliales de Bergman en el cerebelo maduro (Dahl y cols., 1981; Bignami y cols., 1982). Un seguimiento de los cambios de inmunoreactividad de vimentina a GFAP durante el desarrollo de la astroglia posnatal en el cerebro de primates ha sido estudiado por Colombo y cols. (1997b; 2005), que documentan la desaparición temprana de células vimentina-IR en el neuropilo del SNC. Por lo tanto, la observación de la expresión de vimentina en astrocitos reactivos, tras una lesión, puede ser indicativo de que estas células transcurren por un proceso de desdiferenciación. De hecho, las pruebas obtenidas en este estudio sugieren que no hay coincidencia entre la expresión de vimentina y de GFAP con proliferación.

Varios estudios han demostrado que las células de la microglía responden rápidamente a las lesiones del SNC, y que estas células junto con los macrófagos -en diversos estadios de activación- persisten en el sitio de la lesión durante varias semanas (Hampton y cols., 2004). En el presente estudio de Tesis, se han hallado células de microglía en las zonas de lesión, y perilesional, en distintos estadios de activación, aunque la coincidencia con núcleos BrdU-IR sólo se encontró en algunas células. Sin embargo, no hubo coincidencia en los sitios corticales remotos reactivos.

La presencia de células coincidentes en BrdU-IR y NeuN-IR fue examinada en los monos lesionados, así como en zonas similares de los controles intactos. No se encontró coincidencia entre la marcación con BrdU y NeuN en la lesión ni en zona perilesional. En las zonas subventriculares de los monos lesionados e intactos, tampoco se hallaron células doblemente marcadas en los cortes parieto-temporales analizados. Un nivel bajo de neurogénesis en el neocórtex ha sido descrito por otros autores, en monos *macaca* adultos, pero las neuronas recién generadas parecían sobrevivir sólo transitoriamente y no llegaban a diferenciarse en neuronas completamente funcionales (Gould y cols., 1999;

2001; Nowakowski y Hayes, 2000). Los resultados de Koketsu y cols. (2003) apoyan el concepto de que las poblaciones neuronales del neocórtex cerebral en primates adultos, suelen ser estables y son normalmente no renovables. Ese estudio sugiere además que cerca de 35 a 38 % de núcleos BrdU-IR parecen ser de células gliales satélite, generalmente cerca a la superficie neuronal, pero no se lograron identificar con los marcadores gliales analizados, tales como GFAP, S-100 β , O4 o Iba-1.

Se ha comunicado la existencia de neurogénesis en el hipocampo de primates adultos (Kornack y Rakic, 1999; Gould y cols., 2002; Kee y cols., 2002; Sanal y cols., 2004), así como su inhibición por las hormonas que se elevan en situaciones de estrés como el cortisol (Gould y cols., 1998). Los monos *Cebus apella* en las condiciones de nuestra colonia, normalmente presentan altas concentraciones invariables de cortisol en plasma (Lahoz y cols., 2006), lo que concuerda con el perfil característico de otros primates del Nuevo Mundo (véase como ejemplo Coe y cols., 1992). En el presente estudio, no se hallaron núcleos BrdU-IR en las zonas hipocámpicas, lo que podría explicarse en parte por las altas concentraciones invariables de cortisol en plasma características de los monos *Cebus apella* en cautiverio.

Además, dado que el antígeno NeuN se expresa sólo en las células post-mitóticas que están iniciando su diferenciación celular (Muller y cols., 1992), cabe señalar, que en este trabajo no se analizaron marcadores de neuronas inmaduras tales como doblecortina, nestina o tubulina β -III, por lo que estudios adicionales focalizados en este aspecto podrían aportar más información respecto a este tema, que excede el objetivo del presente capítulo de tesis.

Es bien sabido que las células que expresan NG2 muestran cambios reactivos después de lesiones, incluyendo la incorporación de BrdU (véase entre otros, Stallcup, 2002; Levine, 1994; Jones y cols., 2002; Watanabe y cols., 2002; Tan y cols., 2005). En nuestro estudio, la posibilidad de que esos núcleos de BrdU-IR remotos correspondan a

células NG2 intentó ser evaluada pero no se obtuvo éxito en la inmunomarcación en el tejido de mono –incluso con tiempos de fijación postperfusión de 3 horas–, aún probando varios anticuerpos, que incluyeron varios de origen comercial y otros cedidos por el profesor William Stallcup (ver *Metodología* para la descripción). Sin embargo, se logró una muy buena marcación, en cerebros de rata con una fijación leve de 2hs. postperfusión. A raíz de este inconveniente para lograr la inmunomarcación de células NG2, se consultaron investigadores con experiencia en estas inmunomarcaciones, y bibliografía acorde. De todos modos todo sugiere que los resultados con NG2 en primates fueron de dudosa calidad y parciales, teniendo en cuenta que i) La mayoría de los trabajos científicos analizan la marcación en roedores -pero no en primates- la cual se ha logrado satisfactoriamente; ii) los anticuerpos comerciales están desarrollados a partir de antígenos en roedores iii) en primates humanos pocas veces se ha logrado marcar estas células al igual que en material de primates no humanos donde la experiencia con esta marcación es prácticamente nula, reflejada además en la iv) escasez de trabajos publicados al respecto sobre estudios en monos probablemente por la dificultad que presenta la detección del antígeno NG2 en material de este origen (en nuestro conocimiento el único es Peters y Sethares, 2004). Por tales razones, no se pudo especificar si esos núcleos BrdU-IR corresponden a células NG2.

Si bien, el objetivo primario de esta sección de la tesis fue evaluar el efecto local y distante de una lesión en la astrogía cortical, los resultados obtenidos sugirieron la necesidad de analizar otros marcadores para identificar a qué tipo celular corresponden los núcleos BrdU. Sin embargo, no se ha logrado aun determinar la identidad celular de éstos.

CONCLUSIONES

Una lesión focalizada de la corteza prefrontal o estriada de monos *Cebus apella* adultos, dio lugar a una respuesta de incorporación nuclear de BrdU en sitios corticales

distantes a la lesión, predominante en las láminas supragranulares. Se propone que este efecto se llevaría a cabo a través de conexiones cortico-corticales, llegando por lo tanto, a áreas definidas, relacionadas funcionalmente con el sitio de la lesión. Se sostiene además, que los núcleos BrdU-IR pertenecerían a células en la fase S del ciclo celular y potencialmente proliferantes, y no a células en proceso de reparación de su ADN.

Estudios adicionales podrían determinar el tipo celular involucrado en la respuesta de incorporación nuclear de BrdU detectada.

CAPÍTULO III

“ANÁLISIS DE LAS MODIFICACIONES ASTROGLIALES POSTLESIONALES EN LA CORTEZA CEREBRAL DE ROEDORES Y LA POSIBILIDAD DE SU MODULACIÓN POR EXPOSICIÓN PREVIA A LA CONDICIÓN DE ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL“

‘Somos nuestra memoria, somos ese quimérico museo de formas inconstantes, ese montón de espejos rotos’

Jorge Luis Borges (1899-1986)

INTRODUCCIÓN

Los abordajes neurorehabilitatorios se basan en el concepto de compensación, es decir en la reorganización de circuitos neurales sobrevivientes para desempeñar una función previamente atribuida a los circuitos dañados (Robertson y Murre, 1999). En este sentido, los efectos favorables del 'ambiente' sobre los procesos de reparación subsiguientes al daño cerebral han sido estudiados en modelos de roedores mediante pruebas de evaluación de habilidades cognitivas administradas antes y después de la exposición a condiciones de *Enriquecimiento Ambiental (EA)* (Will y cols., 1977; Johansson, 1996; Grossman y cols., 2003; Xerri y cols., 2003). Según varios estudios, ambos abordajes -preventivo y posterior al daño- han probado ser de utilidad para generar impactos positivos en el funcionamiento cognitivo, en modelos con roedores y primates (Newman, 1986; Black y cols., 1987; Farah y cols., 2004; Fisher y cols., 2004; Winocur y cols., 2005). Si bien, se han definido al *EA* y al *entrenamiento cognitivo en una tarea específica* como conceptos no idénticos, la noción de activación de fenómenos de neuroplasticidad es atinente a ambas condiciones. Por tal motivo, se considera pertinente mencionar en este contexto introductorio, que en la U.N.A. se ha obtenido evidencia de que el entrenamiento en actividades cognitivas específicas en monos *Cebus apella*, aplicado previamente a la administración del neurotóxico MPTP, interfiere con el efecto negativo del neurotóxico sobre dicho desempeño cognitivo (Lipina y Colombo, 2007). Es decir, que dicha condición de activación premórbida interfiere con el desarrollo de deficiencias en el procesamiento cognitivo subsiguiente a la administración de un neurotóxico en primates no humanos.

En lo que se refiere al impacto en el substrato celular que subyace a tales procesos, se han detectado -entre otros efectos- una disminución de células apoptóticas; gliogénesis; sinaptogénesis; neurogénesis; aumento en la expresión de factores de

crecimiento neuronal; disminución del volumen lesionado; mayor supervivencia neuronal; e incremento de la densidad de espinas dendríticas (Johansson, 1996; Johansson y Belichenko, 2002; Komitova y cols., 2002; Xerri y Zennou-Azogui, 2003; Lipper-Gruener y cols., 2007; Weiloach y Nikolich, 2006). Es decir, que las investigaciones de regeneración/reparación se han centrado principalmente en el estudio de los efectos del EA postlesional sobre eventos de plasticidad neuronal. En esta Tesis, se plantea el EA como un posible factor preventivo de los efectos de una lesión cortical y se analizan algunos eventos vinculados con la función glial.

La astrogliosis reactiva es un fenómeno del SNC, común a diversos procesos neuropatológicos tales como isquemia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer o esclerosis múltiple, entre otros. Como ya se ha mencionado en los capítulos precedentes, entre otras características se observa hipertrofia del núcleo, soma y procesos celulares; aumento de la expresión de GFAP y vimentina, proliferación y migración celular (Ridet, y cols., 1997).

Asimismo, se ha demostrado que la reactividad astrogliar influye sobre la sinaptogénesis y el número de terminales presinápticos (Emirandetti y cols., 2006). En este contexto cabe mencionar a la *ezrina*, una proteína de la familia de *proteínas de unión a la actina ERM (ezrina-radixina-moesina)*. Estas proteínas interconectan la membrana plasmática con el citoesqueleto de actina, y participarían así en cambios de forma y movilidad celular. Cabe señalar que junto a la radixina, la ezrina se expresa en los *procesos astrocíticos periféricos (PAPs)* involucrados en los mecanismos de regulación de las sinapsis (Derouiche y Frotscher, 2001). Dado que la ezrina aumenta en los astrocitos reactivos y está asociada con el aumento de la capacidad invasiva de tumores astrocíticos (Derouiche y Frotscher, 2001; Emirandetti y cols., 2006), resulta interesante investigar las modificaciones en su expresión en situaciones de reactividad astrogliar que siguen a un daño cerebral.

La lesión del SNC conlleva a eventos celulares que actuando sinérgica o

separadamente, causan la muerte neuronal secundaria (Kim y cols., 2006; Cui y cols., 2009). El aumento postlesión en la concentración de aminoácidos excitatorios hasta niveles excitotóxicos y la subsecuente elevación en la concentración de Ca²⁺ intracelular serían parte de los eventos responsables de la muerte neuronal secundaria (Tator y cols., 1991). Por lo tanto, el rol del transportador astroglial de glutamato EAAT1 en este contexto postlesional, sería de suma importancia, dado que la astrogliía podría amortiguar el efecto citotóxico del glutamato, a través de su recaptación del medio extracelular (Beschoner y cols., 2007).

Recapitulando, las evidencias sugieren que la exposición a EA en una instancia ulterior a una lesión produce ciertos efectos favorables sobre procesos regenerativos y plásticos en el componente neuronal del neuropilo. Es de interés entonces evaluar si la exposición a la condición de EA previa a una lesión en la corteza cerebral de rata, podría modular la respuesta reactiva astroglial postlesional promoviendo una atenuación de la pérdida (efecto “protector”) de las características funcionales del tejido dañado. Para ello, se evaluaron las modificaciones en las inmunomarcaciones de GFAP, vimentina, EAAT1 y ezrina.

METODOLOGÍA

Animales

En todos los casos el uso de animales se ajustó a las normas establecidas por NRC (1996). Los procedimientos realizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética Institucional de CEMIC.

Se utilizaron en total 21 ratas macho *Sprague-Dawley* destetadas a los 21 días de edad (35-49 gramos) y alimentadas con alimento balanceado sólido y agua *ad libitum*. Los animales residieron en su jaula asignada, bajo un régimen de luz/oscuridad (12h/12h)

controlado en forma automática.

Diseño experimental

Fue aleatorizado, dado que los tratamientos se aplicaron al azar en las unidades experimentales (animales). El estudio se efectuó sobre las bases experimentales del paradigma de enriquecimiento ambiental (Grossman y cols., 2002). El área cortical sujeta a estudio bajo este paradigma, ha sido la corteza visual, donde otros autores han verificado sistemáticamente cambios en la plasticidad neuronal.

La condición de *enriquecimiento ambiental* (EA) consistió en 8-10 ratas colocadas en jaulas (dimensiones: 60 x 53 x 35 cm), en las cuales se incluyeron varios niveles, túneles, y obstáculos de tamaño variable (Figura 3.1.M). Estos elementos, junto con los bebederos y fuentes de alimento, fueron cambiados de posición 2 veces por semana. La condición *no enriquecida o estándar* (CE, control) -que constituye la condición estándar en el bioterio de la UNA-CIRHE (CEMIC)- consistió en 2-3 ratas por jaula (dimensiones: 30 x 18 x 15 cm.), con fuente de alimento y bebedero fijos y sin ningún otro tipo de objeto en su interior.

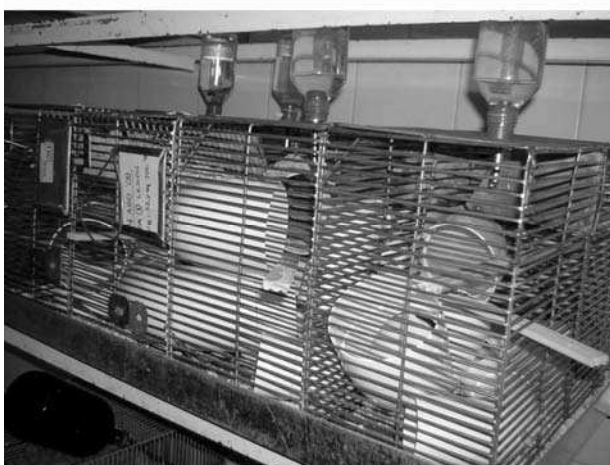


Figura 3.1.M
Jaula experimental de la condición de
Enriquecimiento ambiental.



Los animales de 21 días de edad postnatal (momento del destete) se distribuyeron al azar (por sorteo) entre las condiciones EA o CE y expuestos a ellas por un período de 30 días. Transcurrido este período, un grupo de animales fue lesionado (L) bajo anestesia, en la corteza visual. Otro grupo recibió anestesia pero no fue lesionado (intacto, I). Todos los animales permanecieron en sus jaulas originales por un período adicional de 7 días.

De manera que los tratamientos y grupos experimentales quedaron definidos como: *CEI* (n=3), *EAI* (n=5), *CEL* (n=6), *EAL* (n=7), por la combinación de los factores, *condición ambiente y condición lesión*.

Procedimientos quirúrgicos

Consistieron en procedimientos de “stab wound“, similares a los ya descritos por otros autores (Amat y cols., 1996; Hampton y cols., 2004). Se realizaron en animales anestesiados por vía intraperitoneal (i.p.) con mezcla ketamina-xilacina (10:1) en dosis de 60mg/kg. de mezcla. Se utilizó además lidocaína como anestésico local. Bajo marco estereotáxico, se realizó una craneotomía sobre la zona deseada del hemisferio derecho de cada animal, utilizando como referencia el atlas de Paxinos & Watson (1982). Para la lesión en corteza estriada visual (primaria y secundaria), la craneotomía se ubicó entre las coordenadas (-3; -10) en la dirección anteroposterior respecto de Bregma, y entre (+2; +5) respecto a la línea media. La lesión se realizó con un bisturí (nro. 11). El vértice se ubicó en las coordenadas (-4 bregma; +3 lateral). Se descendió el instrumento 1 mm desde la superficie cortical, de manera de evitar lesionar sustancia blanca. El bisturí se desplazó hasta la coordenada -7 respecto de bregma. La herida fue cerrada con sutura discontinua y desinfectada con iodopovidona 10%. Los animales recibieron una inyección intramuscular de antibiótico (gentamicina) al final de la cirugía. Luego los animales fueron colocados en jaulas individuales durante 24 hs. y bajo lámpara para facilitar la

recuperación de la anestesia y evitar hipotermia. Los animales operados mostraron una satisfactoria recuperación a la cirugía, reanudando su actividad dentro de las 24 hs. subsiguientes.

Inyecciones de Bromodeoxiuridina (BrdU)

Para evaluar la reacción de proliferación postlesional, se aplicaron a los animales experimentales en total 4 inyecciones intraperitoneales de BrdU (en solución en NaCl 0,9 % y filtrado por 22 μm) en dosis de 50 mg/kg de peso corporal. Se administraron día por medio, a partir de las 24 horas posteriores a la lesión. Al séptimo día, la última inyección se administró 2 hs antes de la perfusión.

Fijación del tejido. Obtención y selección de los cortes

Luego de cada experimento los animales fueron anestesiados con tiopental sódico, y perfundidos (vía transcardíaca) con solución fisiológica conteniendo heparina, y luego con paraformaldehído 4% (pH 7,2). Los cerebros e intestinos (control de incorporación de BrdU) fueron fijados por inmersión por un período adicional de 2 horas, y luego embebidos en sacarosa, para su posterior almacenamiento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se obtuvieron con crióstato, cortes coronales seriados de 40 μm de espesor de la corteza visual. Para evitar zonas variables, se seleccionaron cortes incluidos dentro de la zona central del eje antero-posterior del surco de la herida, correspondiente a la zona entre (-5) y (-6) respecto de bregma aproximadamente, excluyendo aquellos de los bordes anterior (-4 a -5, bregma) y posterior (-6 a -7, bregma). Para cada marcador, se tomó una muestra de cortes por individuo empleando un esquema de muestreo sistemático (Howard y Reed, 2005). Se seleccionaron 3-4 cortes consecutivos en total, un corte cada 200 μm . Entre marcadores, los cortes resultaron seriados (Fig. 3.2.M).

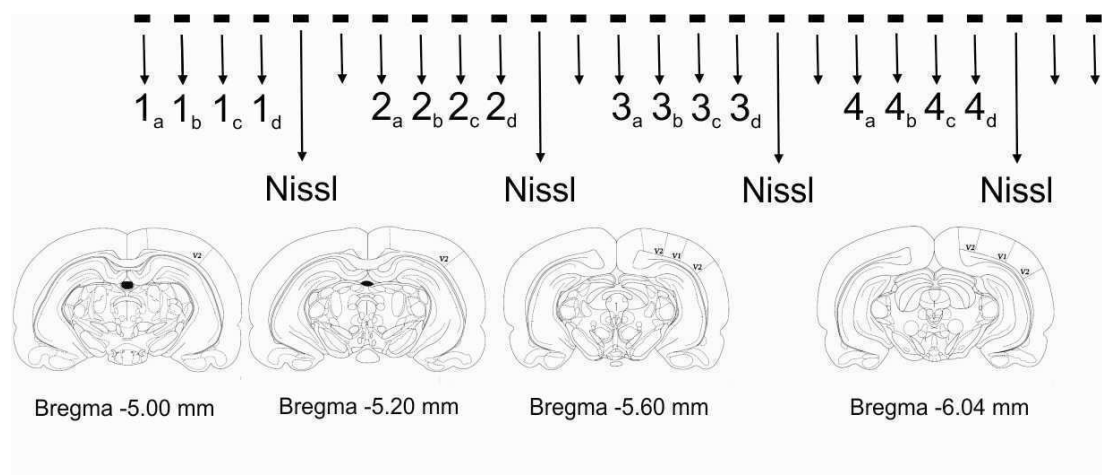


Figura 3.2.M. Esquema que representa el sistema de selección de los cortes de cerebro a analizar. Para cada marcador, se analizaron 3-4 cortes consecutivos en total, un corte cada 200 μm aproximadamente. Entre marcadores, los cortes resultaron seriados. Los perfiles de cerebros, dan ejemplo de los cortes coronales analizados a distintas distancias de bregma. Los números representan el corte (1, 2, 3, 4) y las letras la inmunomarcación aplicada a cada corte (a,b,c,d).

Procedimientos de inmunofluorescencia

Se aplicaron procedimientos de inmunofluorescencia en corte flotante y controles metodológicos previamente implementados en la U.N.A. y especificados en el capítulo II de esta Tesis (Colombo y cols., 1998; 1999; 2000; Schutte y cols., 1987; Campana y cols., 1988).

Los marcadores analizados fueron los siguientes: anti-GFAP (marcador de astrogliá; monoclonal de ratón, conjugado con Cy3, 1/1000; Sigma-Aldrich, USA); anti-Vimentina (marcador de glía inmadura/reactiva; monoclonal de ratón, conjugado con Cy3, 1/500; Sigma-Aldrich, USA); anti-EAAT1 (marcador de transportador de glutamato astrogliá; policlonal de cabra, 1/200; Santa Cruz bt) y posteriormente revelado con anti-IgG de cabra conjugado con FITC (1/200, Sigma-Aldrich, USA); anti-Ezrina (marcador de procesos astrogliáes periféricos vinculados con las sinapsis (PAPs); monoclonal de ratón, 1/200; Santa Cruz bt) y posteriormente revelado con anti-IgG de ratón conjugado con AlexaFluor 488 (1/400; Invitrogen); anti-BrdU (monoclonal de ratón, 1/200; Roche) y posteriormente

revelado con anti-IgG de ratón conjugado con TRITC (1/200; Sigma-Aldrich, USA); anti-Ki-67 (policlonal de conejo, 1/100; Millipore) y posteriormente revelado con anti-IgG de conejo conjugado con conjugado con AlexaFluor 635 (1/200; Invitrogen).

Análisis de la marcación

La observación de los preparados se realizó bajo microscopio óptico equipado con epifluorescencia (Zeiss Axiovert) y las imágenes fueron digitalizadas con cámara CCD. El análisis de las imágenes digitales se realizó con el programa ImageJ (versión 1.43u).

La elección y aplicación de los siguientes procedimientos de análisis se basó en parte en trabajos previos de otros autores (Geiger y cols., 2000; Emirandetti y cols., 2006; Miguel-Hidalgo y cols., 2010).

Para todos los marcadores en estudio, animales experimentales y cortes correspondientes a éstos, se capturaron las siguientes imágenes a una magnificación final de 200X. Se capturaron imágenes de 2 campos: *campo 1*, cercano a la lesión, desde el borde de la herida, sobre el tejido cortical perilesional; y *campo 2*, contiguo al primero, más alejado de la lesión. Se capturaron las imágenes de estos campos 1 y 2, tanto del lado *medial* como del lado *lateral* de la lesión, y en sitios topográficamente equivalentes del hemisferio contralateral (izquierdo) no lesionado (Fig 3.3.M.A). El tamaño de los campos fue de 360x270 μm , correspondiente a las láminas corticales II, III y IV, donde llegó la profundidad de la lesión en la mayoría de los cortes de cerebro (Fig 3.3.M.B, C). Se excluyó la lamina I para evitar la intensa fluorescencia inespecífica de las meninges, común del proceso de inmunofluorescencia, lo cual dificultaba el análisis. Las láminas profundas, V y VI, se excluyeron porque no en todos los casos se encontró que estén incluidas en la zona de lesión.

Dadas las características de las inmunomarcaciones, que no permiten cuantificar células marcadas sin introducir un significativo error de conteo (ya sea por la

interdigitación de los procesos astrogliales, o las marcaciones tipo “puntillado” características de EAAT1 y Ezrina), se optó por cuantificar el área cubierta por marca de cada marcador específico, sobre el área total (% Área). Para cada marcador, se analizó esta variable, como el % área en cada campo a analizar, y además se analizó el % área de acuerdo con la distancia a la lesión en franjas de 60 μm , dentro de los campos correspondientes al hemisferio lesionado (derecho) (6 franjas en cada campo 1 y 2; 12 franjas en total). En ambos tipos de análisis (% área total o en franjas), el procedimiento consistió en fijar un umbral sobre la imagen a analizar para definir la marca inmunoreactiva, respecto a un control negativo (obtenido en el proceso de inmunomarcación, pero evitando el anticuerpo primario). El valor del umbral aplicado fue el mismo para todas las imágenes pertenecientes a la misma marcación inmunoreactiva. Posteriormente se realizó la conversión de las imágenes en binarias, donde el valor del pixel igual a ‘0’ implica ausencia y el valor ‘255’, presencia de inmunomarcación.

Dado que las marcaciones de BrdU y Ki-67 quedaron restringidas al área de la cicatriz lesional y no se observó respuesta de incorporación de BrdU ni marcación de Ki-67 endógeno en núcleos dentro de la corteza perilesional, que justifique su estudio, no se realizó un análisis de estas marcaciones (ver la sección de *Resultados* más adelante).

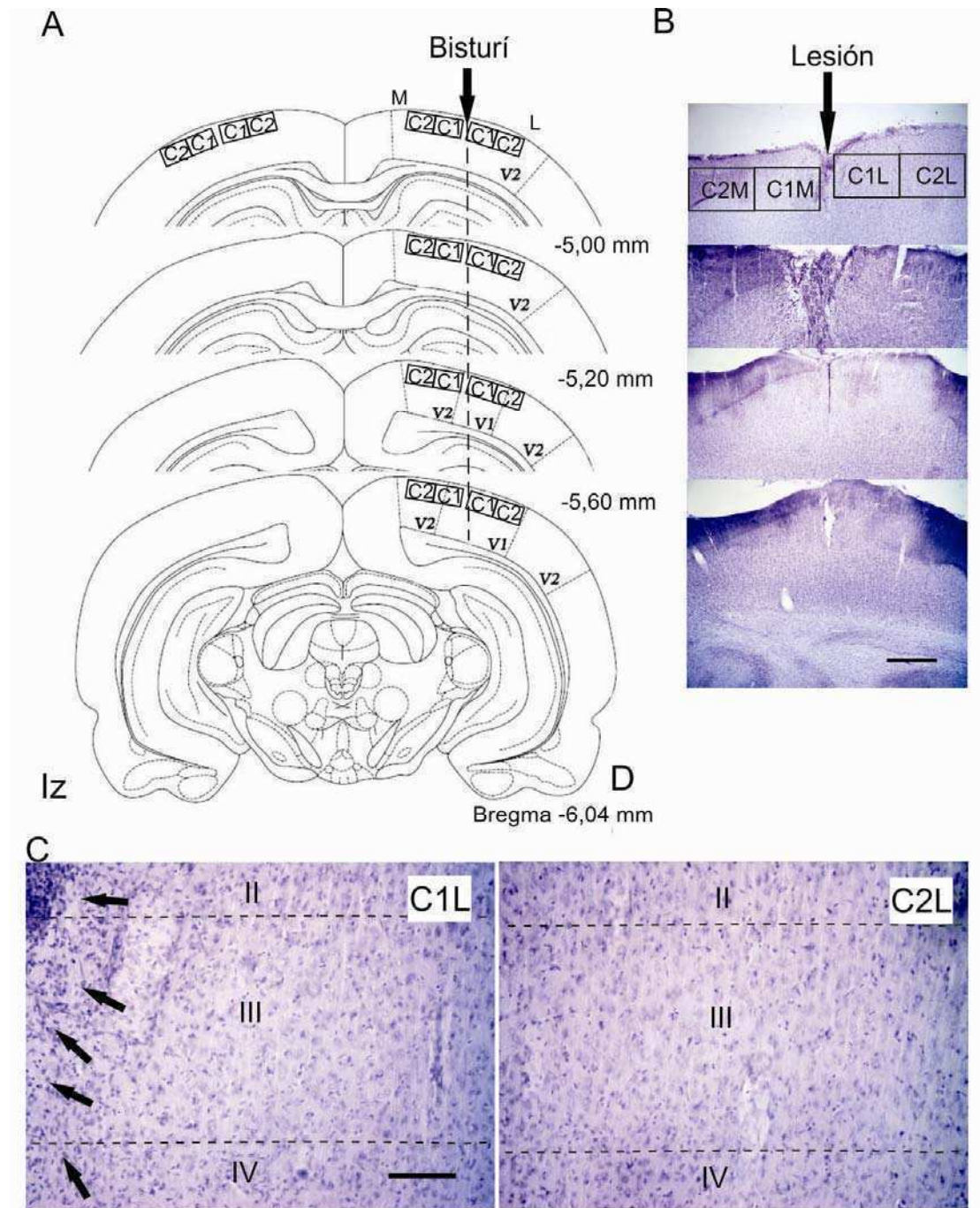


Figura 3.3.M. Esquema de análisis de la marcación. (A) Ubicación de la lesión en los cortes analizados. Se analizaron el campo 1 (C1), cercano a la lesión, y el campo 2 (C2), contiguo, más alejado de la lesión, tanto del lado medial (M) como del lateral (L) de la lesión, y en sitios topográficamente análogos del hemisferio contralateral (izquierdo) no lesionado. V1, V2, corteza visual primaria y secundaria, respectivamente. (B) Tinción de Nissl, de los cortes analizados, esquematizados en A, mostrando la disposición de los campos a analizar. (C) Imagen aumentada del campo 1 y 2 laterales a la lesión (C1L, C2L), esquematizados en B. El tamaño de los campos fue de 360x270 μm , correspondiente a las láminas corticales II, III y IV. Nótese la reacción celular (flechas) sobretodo en la cercanía a la lesión. Barra: B, 500 μm ; C, 100 μm .

Análisis estadístico

Dado que se cumplieron los supuestos de normalidad y de homocedasticidad (por medio de la aplicación del Test de *Kolmogorov-Smirnov* y Test de *Levene*, respectivamente), se realizó un análisis de varianza univariado, multifactorial, de factores fijos, cruzados (ANOVA factorial). El análisis de cada inmunomarcación en estudio, se realizó por separado. La variable a analizar fue % *Área* (área cubierta por marca inmunoreactiva relativa al área total analizada, e.g área del campo 1 o 2, según corresponda). En los marcadores donde no se encontró un efecto en el hemisferio contralateral intacto (izquierdo), los valores de la variable en el hemisferio lesionado (derecho), se normalizaron con los primeros, de manera de controlar las posibles diferencias entre animales y cortes dentro de cada grupo experimental. La nueva variable $\Delta\%Área$, consistió en $\% \text{Área}_{(\text{derecho-izquierdo})} - X_{\text{mínimo}}$, donde $X_{\text{mínimo}}$, es el menor de los valores negativos en el grupo de datos correspondiente al grupo experimental, lo que agrega un término que implica una transformación lineal de la variable de manera de que sólo tenga valores positivos. Dado que se trata de una transformación lineal, la distribución de los datos no varía.

Los factores que se incluyeron dentro del modelo de ANOVA fueron cinco: *ambiente* (enriquecido, EA; no enriquecido o condición estándar, CE); *lesión* (lesionado, L; intacto, I); *hemisferio* (derecho, izquierdo); *lado* (medial a la lesión, M; lateral a la lesión, L; o zonas equivalentes en el hemisferio intacto); *campo* (campo 1; campo 2).

Cuando la interacción entre los factores dio no significativa, se analizaron los efectos principales de los factores que no interaccionaron. Cuando la interacción entre factores dio significativa, se realizaron comparaciones múltiples entre los distintos niveles de los factores donde se detectó interacción, utilizando el test de Tukey. Este test a su vez, nos permitió identificar diferencias significativas *pos hoc*.

Con los valores de la variable obtenidos en los hemisferios derechos (lesionados y

en los no lesionados de los animales intactos), se realizaron estudios de Regresión para evaluar la relación de la variable dependiente % *Área inmunoreactiva (IR)* (o la variable normalizada) con la variable independiente *distancia* (μm) desde la lesión, la cual está definida por las franjas. Dado el gran número de datos, en todos los casos se muestran los diagramas de dispersión de las *medias* $\pm 2.EEM$ (*Error Estándar Muestral*) de la variable dependiente para cada valor de la variable *distancia*. En cada caso, se buscó la curva de regresión que mejor ajustara a los datos de cada inmunomarcación, según el coeficiente de determinación R^2 ajustado. En los casos donde fue necesario ajustar los datos a una función lineal, se introdujo una transformación apropiada a la variable independiente, dada por su inversa $1/distancia$. Las diferencias entre los coeficientes de regresión y entre las ordenadas al origen, de los grupos experimentales, se evaluaron comparando los intervalos de confianza respectivos al 95%.

En todos los análisis, la probabilidad del error Tipo I se mantuvo en 0,05 para diferencias significativas o en 0,01 para diferencias muy significativas. Para efectuar los análisis se utilizaron los programas de estadística Stata Intercooler (versión 8.0) o SPSS (versión 12.0).

RESULTADOS

Las marcaciones con BrdU y Ki-67, quedaron ambas restringidas a núcleos celulares ubicados dentro de la zona cicatricial de la lesión, por lo que no se encontró fundamento para analizar estas marcaciones en la zona cortical perilesional de interés (Fig. 3.1).

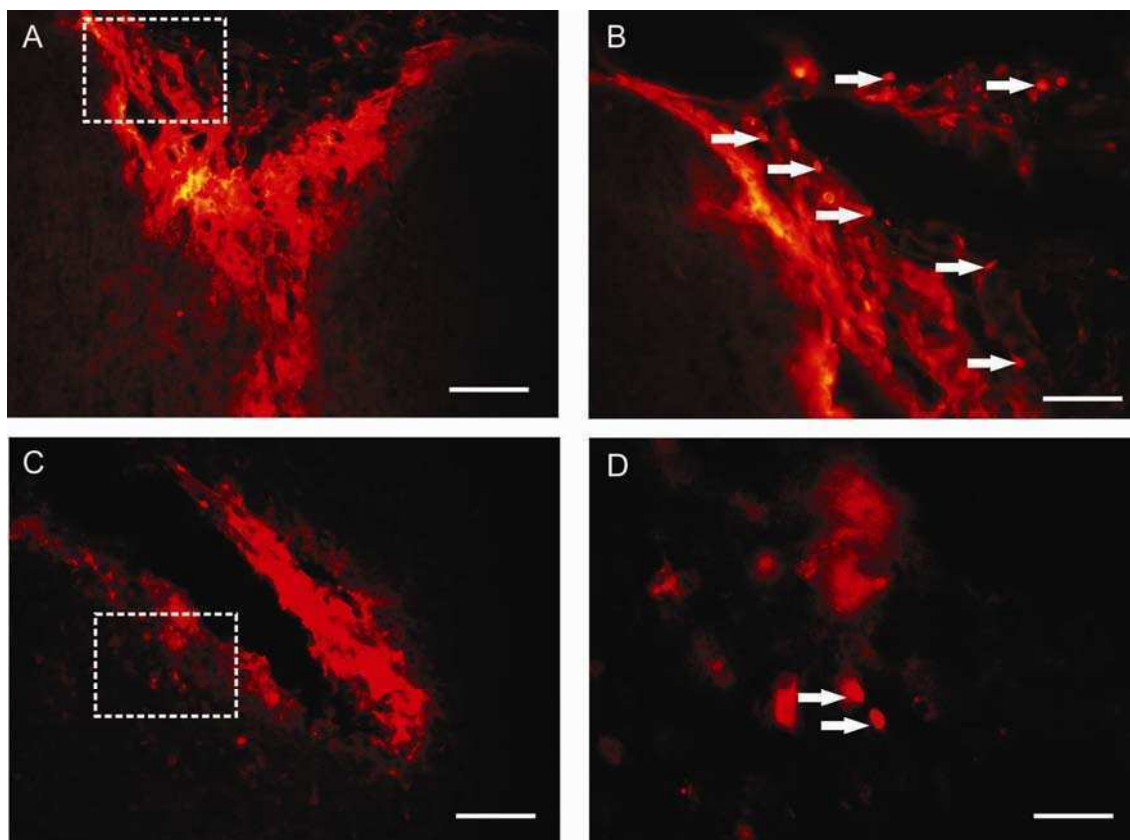


Figura 3.1. Inmunomarcaciones de BrdU y Ki-67, quedaron ambas restringidas a núcleos (flechas) dentro de la zona cicatricial de la lesión. (A) BrdU. Barra, 100 μ m. (B) Inserto en A. Barra, 50 μ m. (C) Ki-67. Barra, 100 μ m. (D) Inserto en C. Barra, 30 μ m.

1. Astroglía reactiva: GFAP

En el hemisferio derecho de los animales lesionados, se observó astroglía reactiva típica, con hipertrofia del soma y procesos GFAP-inmunoreactivos (IR), no observada en el hemisferio contralateral (izquierdo) ni en los animales intactos (Fig. 3.1.1).

Para analizar el efecto del enriquecimiento en esta reacción astrogliar, se realizó un análisis de varianza univariado multifactorial de la variable % *Área GFAP-IR* (ver sección *Metodología* para descripción del modelo). No se detectó interacción del factor *lado* con ninguno de los otros factores ($p \geq 0,179$), y no se detectaron diferencias significativas entre los grupos ($p = 0,759$), por lo que se puede inferir que no hay diferencia entre el lado medial y el lateral en cuanto a la marcación con GFAP. Por lo tanto, se promediaron estos valores con el resto de los datos antes de continuar con el análisis.

Entre los factores ambiente, lesión, hemisferio y campo se detectaron interacciones muy significativas, dobles o triples ($p < 0,01$, en todos los casos) por lo que los efectos de estos factores se analizaron por comparaciones múltiples entre los grupos experimentales con el test de Tukey.

No se detectó un efecto del enriquecimiento en la marcación basal de GFAP, en ambos hemisferios de los animales intactos ($p = 1,000$), ni en el hemisferio contralateral de los animales lesionados, expuestos a la condición EA ($p = 1,000$) (Fig. 3.1.2.A).

La lesión indujo un aumento de la marcación GFAP-IR, en los hemisferios lesionados (derechos), en los animales previamente expuestos a EA y en los no expuestos (CE, previa a la lesión), dado que la comparación con las medias de los hemisferios contralaterales intactos y con las medias de grupos intactos (en ambas condiciones ambientales), arrojaron diferencias muy significativas ($p < 0,01$, en todas las comparaciones) (Fig. 3.1.2.A). La comparación entre campo 1 (cercano a la lesión) y campo 2 (contiguo, más alejado de la lesión), en ambas condiciones ambientales, también arrojó diferencias muy significativas ($p < 0,01$), detectándose, una mayor marcación GFAP-IR en el campo más cercano a la lesión (campo 1) (Fig. 3.1.2.A).

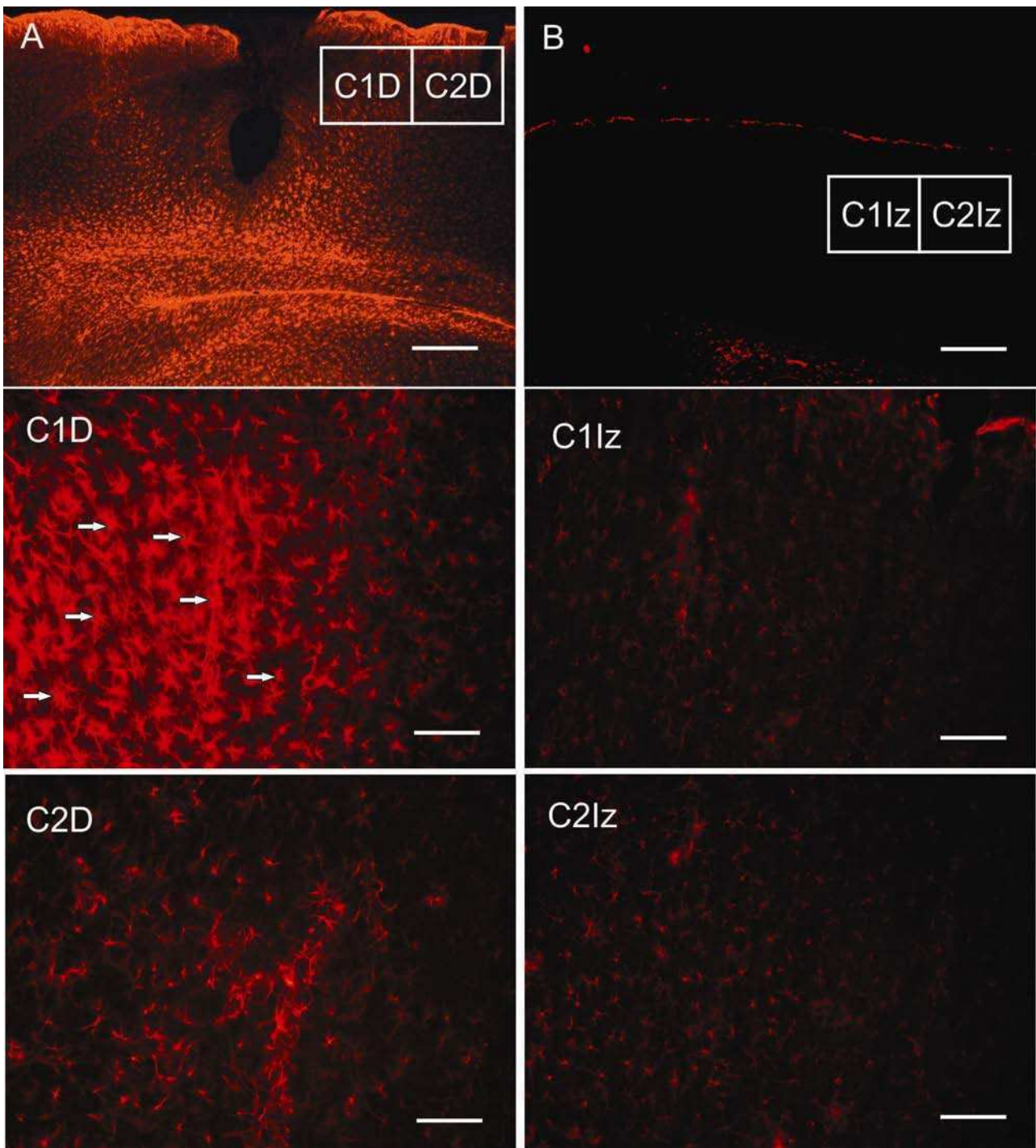
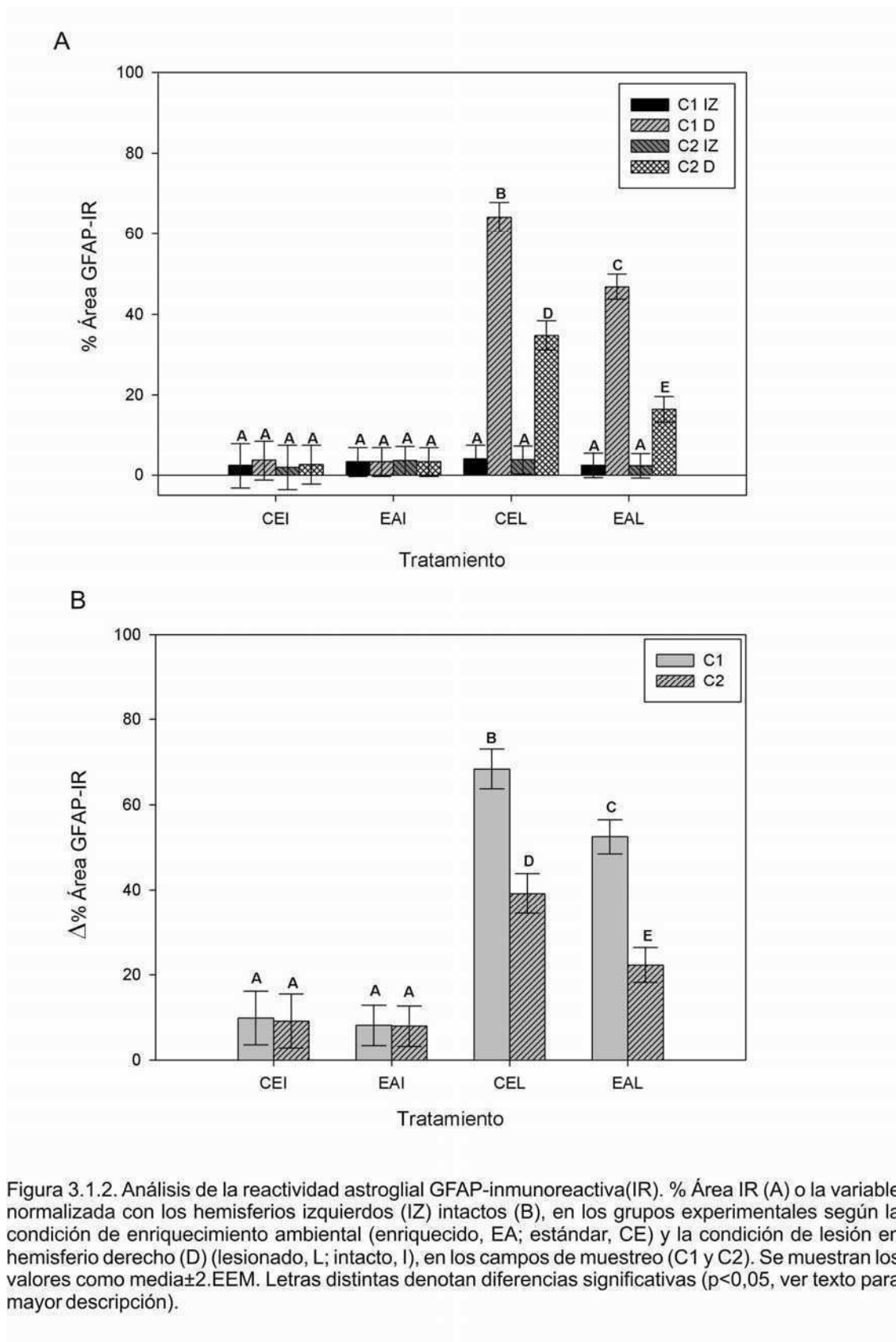


Figura 3.1.1. Astroglia GFAP-IR en hemisferio derecho lesionado (A) e izquierdo intacto (B). Barra, 400 μm . Abajo se muestran los campos de análisis respectivos especificados en A y B. Barra, 100 μm . Nótese la astrogliosis reactiva típica, con hipertrofia del soma y procesos (flechas) en el hemisferio lesionado derecho (sobre todo en C1), no observada en el hemisferio izquierdo ni en los animales intactos.

La exposición a la condición de EA previa a la lesión, indujo un aumento significativamente menor de la respuesta postlesional reactiva astrogliosis GFAP-IR en ambos campos ($p < 0,01$) (Fig. 3.1.2.A).

Dado que no se detectaron efectos del EA en los niveles basales (hemisferio contralateral intacto, izquierdo), los valores de la variable en el hemisferio



lesionado (derecho), se normalizaron con los primeros, de manera de controlar las posibles diferencias entre animales y cortes dentro de cada grupo experimental. Se repitió el análisis de la varianza con la nueva variable $\Delta\%Área\ GFAP-IR$ (ver explicación en la sección *Metodología*). En este caso, no se incluyó el factor *hemisferio*, en el ANOVA. Los resultados no difieren de aquellos obtenidos con la variable no normalizada (Fig. 3.1.2.B).

Las pruebas de regresión lineal simple resultaron muy significativas en los animales lesionados en ambas condiciones ambientales ($p < 0,01$, en ambos casos), con un ajuste a una función lineal de la relación entre las variables $\Delta\%Área\ GFAP-IR$ y *distancia* (μm) (Fig. 3.1.3). Las pruebas de regresión para los animales intactos resultaron no significativas, en ambas condiciones ambientales ($p = 0,821$, CEI; $p = 0,959$, EAI). En la Tabla de la figura 3.1.3, se muestran los valores del coeficiente de regresión, la ordenada al origen y el coeficiente de determinación R^2 ajustado, de los grupos lesionados, junto con sus intervalos de confianza obtenidos al 95%. Los coeficientes de regresión negativos indican que la relación entre las variables es inversa, es decir que a medida que aumenta la distancia de la lesión (franjas mayores) disminuye el $\Delta\%Área\ GFAP-IR$. La comparación entre los coeficientes de regresión de las curvas de CEL y EAL resultaron no significativas ($p \geq 0,05$), sugiriendo que en ambos casos las variaciones de la marcación GFAP-IR respecto a la distancia desde la lesión son similares (Fig. 3.1.3). Sin embargo, se detectaron diferencias significativas entre los intervalos de confianza pertenecientes a las ordenadas al origen de ambas rectas ($p < 0,05$), resultando menor la correspondiente al grupo EAL, coincidiendo con lo expuesto previamente en la figura 3.1.2.

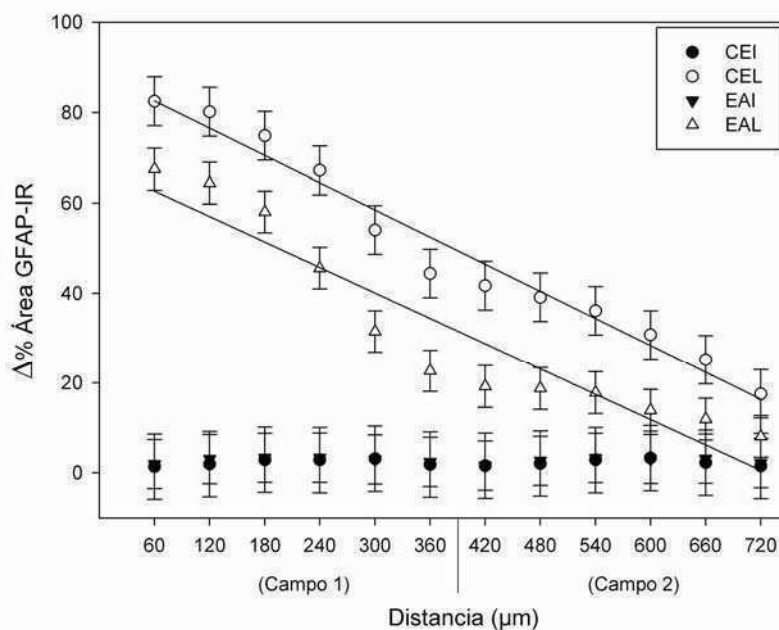


Tabla. Regresión lineal simple $\Delta\% \text{Área GFAP-IR} = y_0 + a \cdot \text{Distancia}$

Grupo	a	IC _a (95%)	y ₀	IC _{y₀} (95%)	R ² ajustado
CEL	-0,100	(-0,112 — -0,088)	88,584	(83,574 — 93,593)*	0,966
EAL	-0,094	(-0,094 — -0,074)	68,342	(59,324 — 77,359)*	0,884

*p<0,05

Figura 3.1.3. Diagramas de dispersión de las medias ± 2 .EEM de la variable $\Delta\% \text{Área GFAP-IR}$ para cada valor de la variable *distancia* (μm). Se muestran las rectas de regresión lineal simple en los grupos experimentales donde se halló significancia en la prueba. En la Tabla, se muestran los valores del coeficiente de regresión (*a*), la ordenada al origen (*y*₀) y el coeficiente de determinación (*R*² *ajustado*), de los grupos lesionados, junto con sus intervalos de confianza obtenidos al 95%.

2. Astroglía reactiva II: Vimentina

Para evaluar la existencia de diferencias entre los grupos experimentales, se realizó un análisis de varianza univariado multifactorial de la variable *% Área Vimentina-IR*.

No se detectó interacción del factor *lado* con ninguno de los otros factores ($p \geq 0,502$), y no se detectaron diferencias significativas entre los grupos ($p = 0,781$), por lo que se puede inferir que no hubo diferencias entre el lado medial y el lateral en cuanto a la marcación con vimentina. Por lo tanto, se promediaron estos valores con el resto de los datos antes de continuar con el análisis.

El efecto de la lesión, se evaluó en comparaciones múltiples con los niveles de los otros factores, por presentar interacción. La lesión indujo la expresión de células vimentina-IR, en el hemisferio derecho de los animales lesionados, no observada en el hemisferio contralateral (izquierdo) ni en los animales intactos ($p < 0,01$; $p \geq 0,899$ entre basales y con los hemisferios no lesionados) (Fig. 3.2.1; 3.2.2.A).

En este caso, el factor *ambiente* no presentó interacción con ninguno de los otros factores, y las diferencias entre grupos resultaron no significativas ($p = 0,343$), por lo que no hubo efecto del enriquecimiento ni en los niveles basales ni en la reacción glial vimentina-IR inducida por la lesión cortical (Fig. 3.2.2.A).

La marcación en los animales lesionados, resultó con diferencias muy significativas entre los campos 1 y 2 del hemisferio lesionado ($p < 0,01$), con niveles en el campo 2 que no superaron los niveles basales ($p = 0,997$), por lo que la marcación vimentina-IR, quedó restringida al campo 1 (cercano a la lesión) (Fig. 3.2.2.A).

Dado que no se detectaron efectos del EA en los niveles basales (hemisferio contralateral intacto, izquierdo), los valores de la variable en el hemisferio lesionado (derecho), se normalizaron con los primeros, de manera de controlar las posibles diferencias entre animales y cortes dentro de cada grupo experimental.

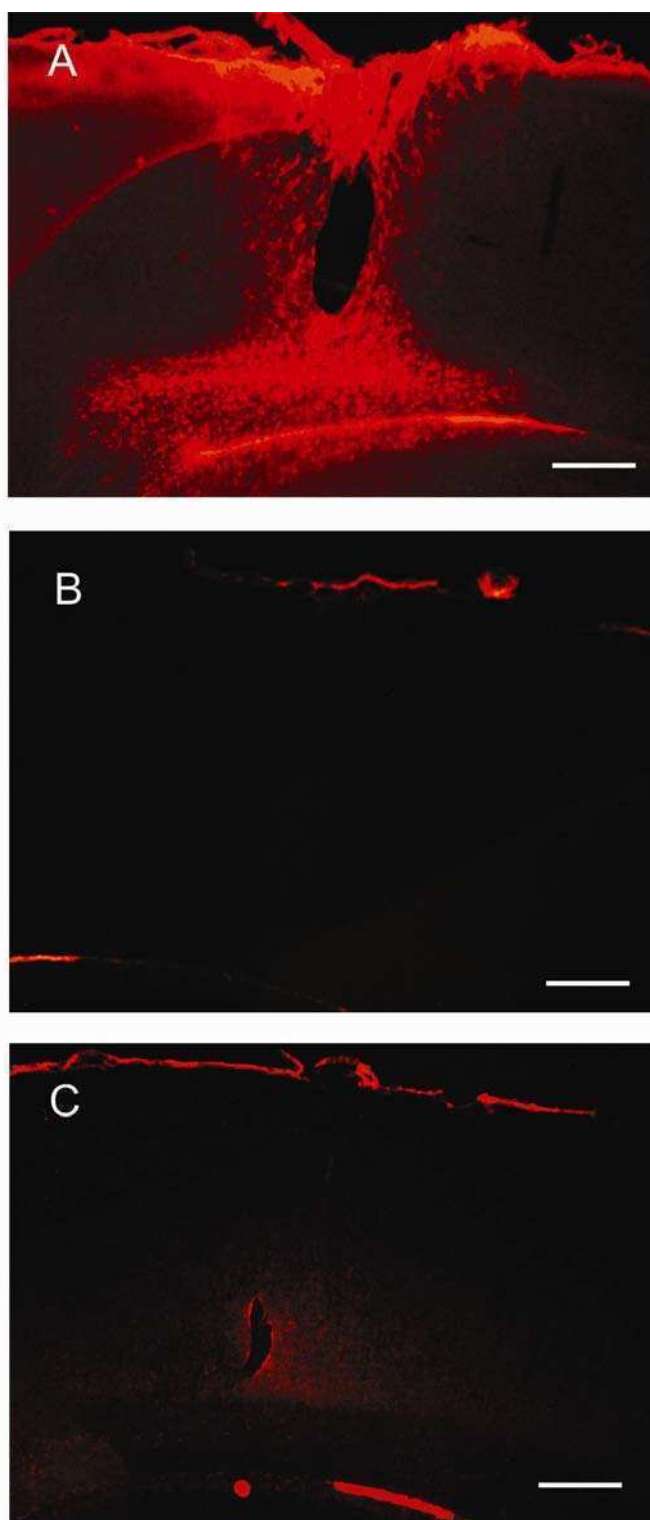


Figura 3.2.1. Inmunomarcación de vimentina-IR. La lesión indujo la expresión de células vimentina-IR (A), no observada en el hemisferio contralateral (izquierdo) (B) ni en los animales intactos (C). Barra, 400 μm .

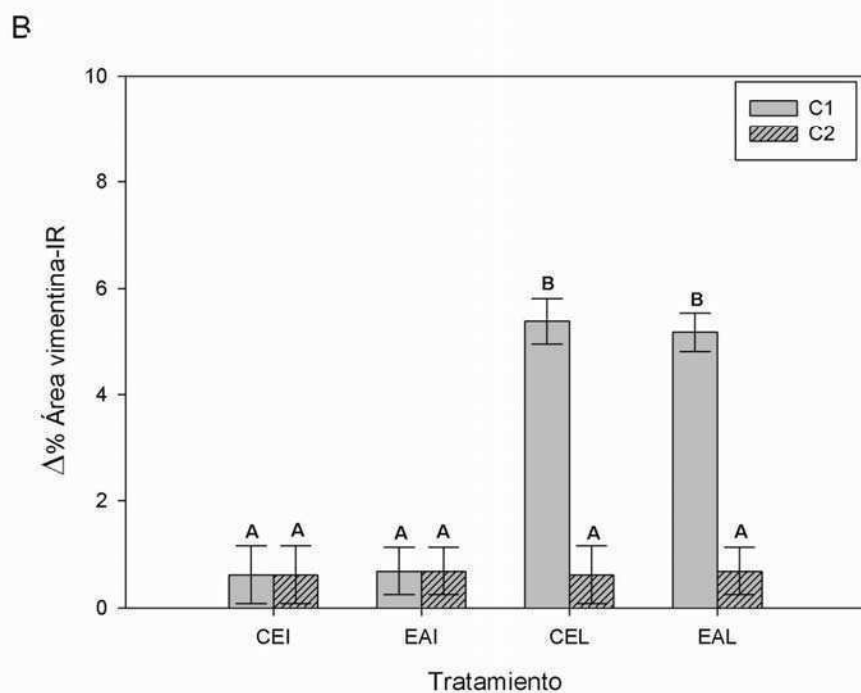
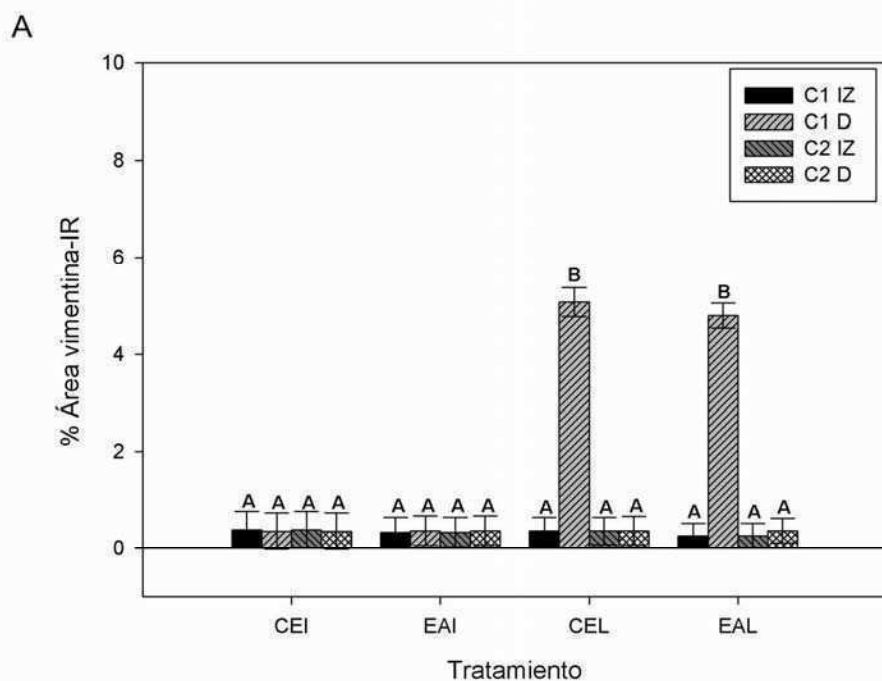


Figura 3.2.2. Análisis de la reactividad astrogliar Vimentina-inmunoreactiva(IR). % Área IR (A) o la variable normalizada con los hemisferios izquierdos (IZ) intactos (B), en los grupos experimentales según la condición de enriquecimiento ambiental (enriquecido, EA; estándar, CE) y la condición de lesión en hemisferio derecho (D) (lesionado, L; intacto, I), en los campos de muestreo (C1 y C2). Se muestran los valores como $\text{media} \pm 2 \cdot \text{EEM}$. Letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$, ver texto para mayor descripción).

Los resultados del ANOVA con la variable normalizada $\Delta\%Área\ vimentina-IR$ no difirieron de los obtenidos con la variable no normalizada (Fig. 3.2.2.B).

Las pruebas de regresión lineal simple para las variables $\Delta\%Área\ vimentina-IR$ y *distancia* (μm), resultaron no significativas para los animales intactos en ambas condiciones ambientales ($p = 0,821$, CEI; $p = 0,959$, EAI). Para los animales lesionados, la regresión lineal dio significativa en ambas condiciones ambientales ($p < 0,05$). Sin embargo, los valores del R^2 ajustado sugieren que la relación entre las variables, se explica mejor con una *función recíproca de primer orden* (Fig. 3.2.3.A). La relación entre las variables es inversa, es decir que a medida que aumenta la distancia de la lesión (franjas mayores) disminuye el $\Delta\%Área\ vimentina-IR$ tendiendo al valor de la constante y_0 . Para ajustar los datos a una función lineal, se introdujo una transformación apropiada a la variable independiente, dada por su inversa $1/distancia$ (μm) (Fig. 3.2.3.B). En las Tablas de la figura 3.2.3, se muestran los valores del coeficiente de regresión, la constante y el coeficiente de determinación R^2 ajustado, de la regresión lineal, la recíproca, y la regresión lineal con la transformación de la variable independiente, de ambos grupos lesionados, junto con sus intervalos de confianza obtenidos al 95%. En todas las regresiones, la comparación entre los intervalos de confianza de los coeficientes de regresión de las curvas de CEL y EAL, resultó no significativa ($p \geq 0,05$), al igual que entre los intervalos de confianza pertenecientes a la constante y_0 ($p \geq 0,05$), sugiriendo que en ambos casos las variaciones de la marcación vimentina-IR respecto a la distancia desde la lesión son similares (Fig. 3.2.3).

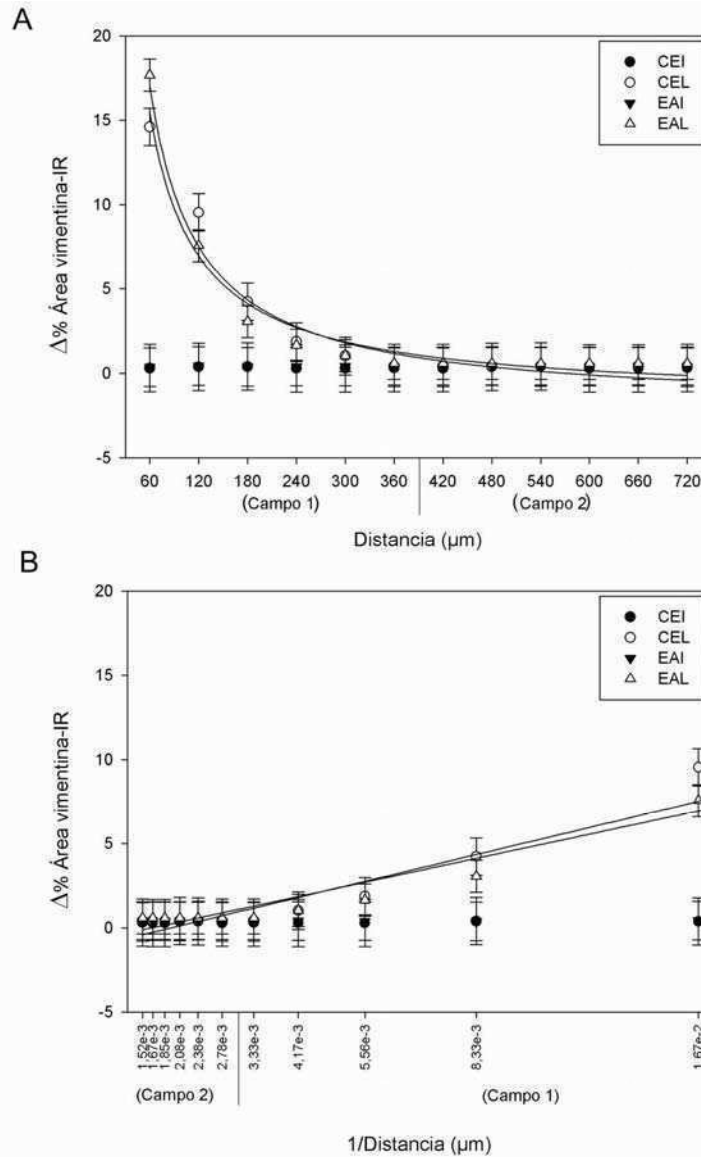


Tabla A. Regresión lineal simple $\Delta\%$ Área Vim-IR = $y_0 + a \cdot \text{Distancia}$

Grupo	a	IC _a (95%)	y ₀	IC _{y₀} (95%)	R ² ajustado
CEL	-0,016	(-0,025 — -0,007)	9,076	(5,197 — 12,955)	0,526
EAL	-0,016	(-0,027 — -0,005)	9,177	(4,399 — 13,955)	0,414

Tabla B. Regresión Recíproca de primer orden $\Delta\%$ Área Vim-IR = $y_0 + a(1/\text{Distancia})$

Grupo	a	IC _a (95%)	y ₀	IC _{y₀} (95%)	R ² ajustado
CEL	1019,181	(879,400 — 1158,961)	-1,540	(-2,381 — -0,698)	0,951
EAL	1142,247	(1029,972 — 1254,521)	-1,999	(-2,675 — -1,323)	0,974

Tabla C. Regresión lineal simple con transformación de variable Distancia $\Delta\%$ Área Vim-IR = $y_0 + a \cdot \text{Distancia}_{-1}$, donde $\text{Distancia}_{-1} = 1/\text{Distancia}$

Grupo	a	IC _a (95%)	y ₀	IC _{y₀} (95%)	R ² ajustado
CEL	1019,181	(879,400 — 1158,961)	-1,540	(-2,381 — -0,698)	0,951
EAL	1142,247	(1029,972 — 1254,521)	-1,999	(-2,675 — -1,323)	0,974

Figura 3.2.3. Diagramas de dispersión de las medias ± 2 EEM de la variable $\Delta\%$ Área GFAP-IR para cada valor de la variable distancia (μm). Se muestran las curvas de regresión en los grupos lesionados, donde se halló significancia en las pruebas. La *regresión lineal simple* dio significativa en ambas condiciones de enriquecimiento ($p < 0,05$, Tabla A). Sin embargo, la relación entre las variables, se explica mejor con una *función recíproca de primer orden* (Fig. A y Tabla B). Para ajustar los datos a una función lineal, se introdujo una transformación a la variable independiente, dada por su inversa $1/\text{distancia}$ (Fig. B y Tabla C). En las Tablas, se muestran los valores del coeficiente de regresión (a), la constante (y_0) y el coeficiente de determinación (R^2 ajustado), de los grupos lesionados, junto con sus intervalos de confianza obtenidos al 95%.

3. Transportadores de glutamato astrogliales: EAAT1

La inmunomarcación del transportador de glutamato astrogliar EAAT1, resultó homogénea, independientemente de la condición de lesión y/o condición ambiental (Fig. 3.3.1).

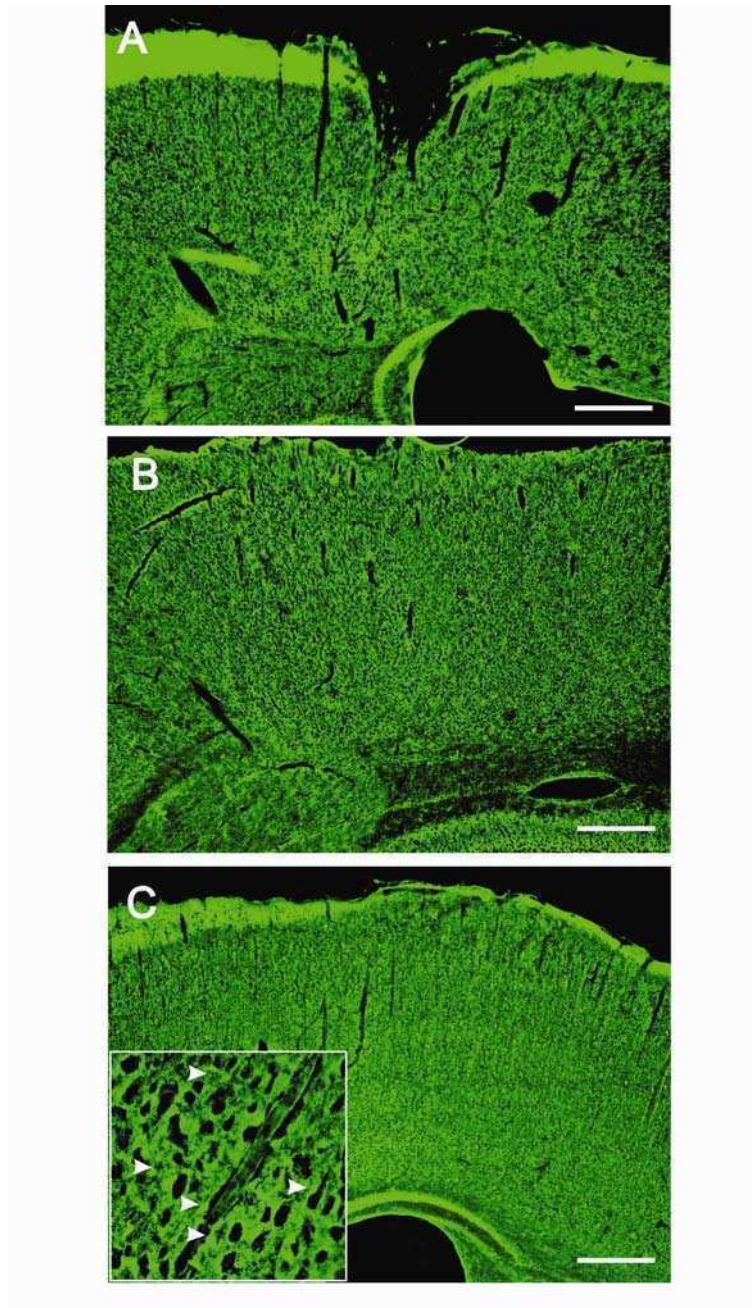


Figura 3.3.1. Inmunomarcación EAAT1-IR. Resultó homogénea en el neuropilo de la corteza visual lesionada (A), contralateral intacta (B), o perteneciente a los animales intactos (C). Barra, 400 μ m. *Inserto*, 100 μ m. Flechas, agrupaciones de transportadores («punctare») EAAT1-IR.

En la ANOVA no se detectaron interacciones entre ninguno de los factores ($p \geq 0,141$), ni diferencias significativas entre los grupos, según el factor *lado* ($p=0,865$) y *campo* ($p=0,188$), por lo que se promediaron estos valores con el resto de los datos antes de continuar con el análisis.

No se detectaron diferencias significativas entre los grupos experimentales según los tratamientos, lesión ($p=0,835$) ni condición ambiental ($p=0,404$), por lo que no hubo efecto de éstos en el % *Área-EAAT1-IR* (Fig. 3.3.2.A). Resultados similares se obtuvieron con los datos normalizados, $\Delta\%$ *Área EAAT1-IR* (Fig. 3.3.2.B).

Las pruebas de regresión lineal simple para las variables $\Delta\%$ *Área EAAT1-IR* y *distancia* (μm) resultaron no significativas en todos los casos, lesionados e intactos ($p \geq 0,338$) (Fig. 3.3.3).

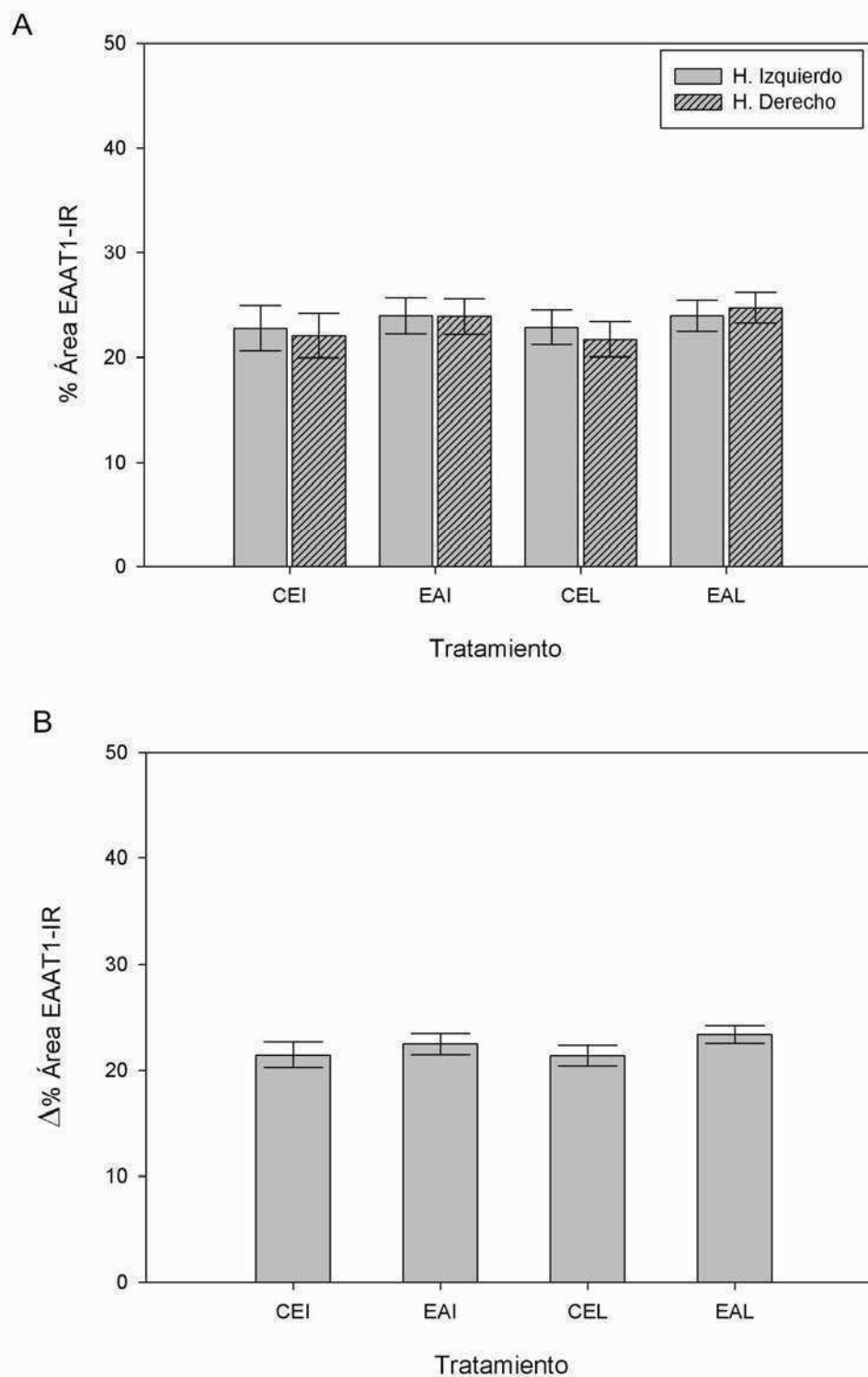
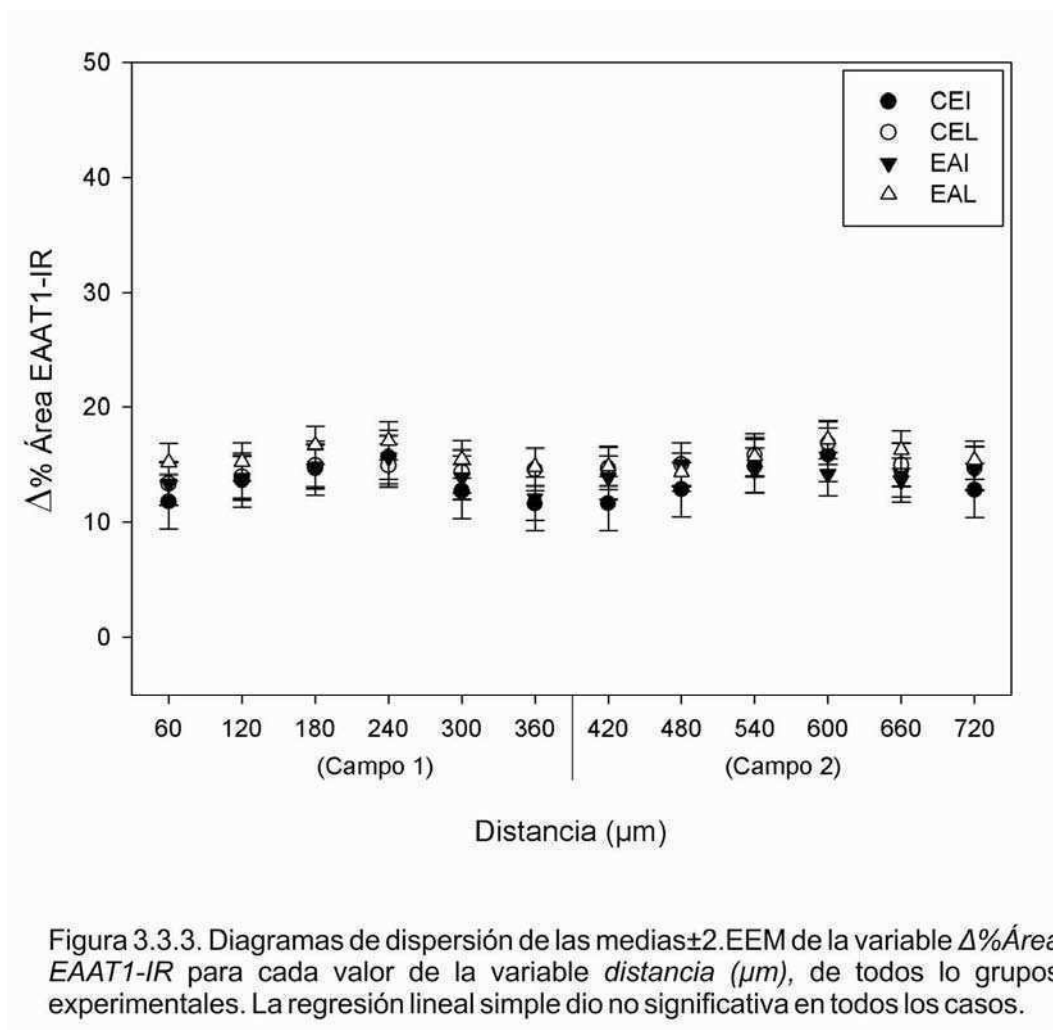


Figura 3.3.2. Análisis de la inmunomarcación de transportadores de glutamato astrogliales EAAT1-inmunoreactivos(IR). % Área IR (A) o la variable normalizada con los hemisferios izquierdos intactos (B), en los grupos experimentales según la condición de enriquecimiento ambiental (enriquecido, EA; estándar, CE) y la condición de lesión en hemisferio derecho (lesionado, L; intacto, I). Se muestran los valores como media \pm 2.EEM. No se detectaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales (ver texto para mayor descripción).

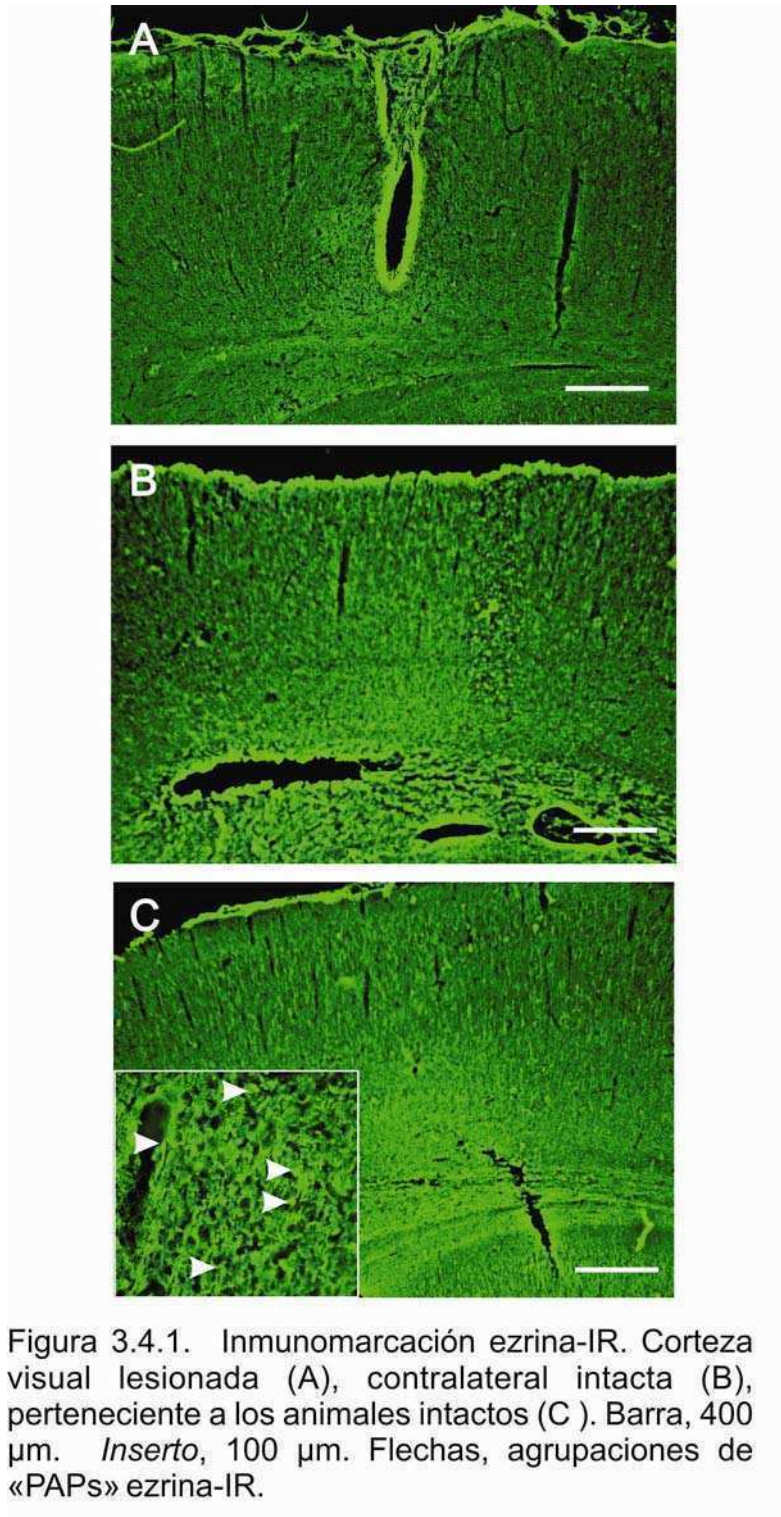


4. Procesos astrogliales periféricos (PAPs) sinápticos: Ezrina

La inmunomarcación de ezrina mostró un patrón de distribución típico en todos los grupos experimentales (Fig. 3.4.1).

Para analizar el efecto del enriquecimiento y de la lesión en la inmunomarcación de ezrina, se realizó un análisis de varianza univariado multifactorial de la variable *% Área ezrina-IR*.

No se detectó interacción del factor *lado* con ninguno de los otros factores ($p \geq 0,336$), y no se detectaron diferencias significativas entre los grupos respecto a este factor ($p = 0,582$), por lo que se puede inferir que no hay diferencia entre el lado medial y el lateral en cuanto a la marcación de ezrina. Tampoco se detectó interacción del factor *campo* con ninguno



de los otros factores ($p \geq 0,129$), y no se detectaron diferencias significativas entre los grupos respecto a este factor ($p = 0,102$). Por lo tanto, se promediaron estos valores con el resto de los datos antes de continuar con el análisis.

Entre los factores ambiente, lesión y hemisferio se detectaron interacciones significativas, dobles y triples (ambiente*lesión, $p < 0,01$; ambiente*lesión*hemisferio, $p < 0,05$) por lo que los efectos de estos factores se analizaron por comparaciones múltiples entre los grupos experimentales con el test de Tukey.

Se detectó un efecto del enriquecimiento en la marcación basal de ezrina en ambos hemisferios, detectándose diferencias muy significativas en % *Área ezrina-IR* de los animales intactos expuestos a enriquecimiento (EAI), respecto a los animales intactos no expuestos a esta condición (CEI, $p < 0,01$; Fig. 3.4.2).

En los animales ubicados en condición estándar (CE), la lesión indujo un aumento del % *Área ezrina-IR* en ambos hemisferios ($p < 0,05$, para ambos hemisferios; Fig. 3.4.2).

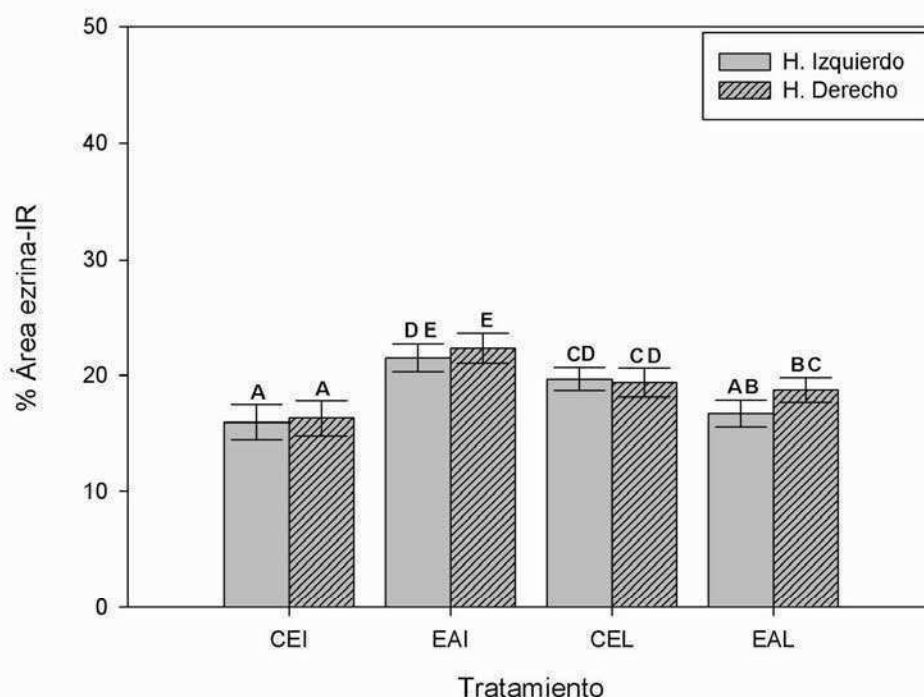


Figura 3.4.2. Análisis de la inmunomarcación de procesos astrogiales periféricos (PAPs) sinápticos, Ezrina-inmunoreactivos(IR). % Área IR en los grupos experimentales según la condición de enriquecimiento ambiental (enriquecido, EA; estándar, CE) y la condición de lesión en hemisferio derecho (lesionado, L; intacto, I). Se muestran los valores como media \pm 2.EEM. Letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$, ver texto para mayor descripción).

En el grupo expuesto a la condición de enriquecimiento ambiental y lesionado (EAL), no se detectó efecto de la lesión en el hemisferio contralateral ($p \geq 0,225$, respecto al grupo CEI). En el hemisferio lesionado del grupo EAL, se detectó una inmunomarcación similar a la encontrada en los lesionados en condición estándar (CEL, $p = 0,163$) y significativamente menor a la detectada en los animales intactos expuestos a enriquecimiento (EAI, $p < 0,01$; Fig. 3.4.2). Es decir que la lesión disminuyó de manera significativa la inmunomarcación de ezrina inducida por el enriquecimiento en el grupo intacto (EAI) (Fig. 3.4.2).

Dado que se detectaron efectos tanto de la lesión como del enriquecimiento en el hemisferio izquierdo (contralateral a la lesión; interacción ambiente*lesión*hemisferio significativa, $p < 0,05$), no es correcto en este caso, realizar la normalización de los datos entre hemisferios derecho e izquierdo ($\Delta\% \text{Área ezrina-IR}$), ya que se encubrirían los efectos.

Las pruebas de regresión lineal simple resultaron no significativas en todos los grupos experimentales ($p \geq 0,10$). En el caso de los grupos de animales lesionados (CEL y EAL), la relación entre las variables $\% \text{Área ezrina-IR}$ y *distancia* (desde la lesión), se explica con una *función recíproca de primer orden* (Fig. 3.4.3.A). Para una mejor visualización de las curvas, en este caso no se muestran los datos de los grupos de animales no lesionados. La relación entre las variables es inversa, es decir que a medida que aumenta la distancia de la lesión (franjas mayores) disminuye el $\% \text{Área ezrina-IR}$ tendiendo al valor de la constante y_0 . Para ajustar los datos a una función lineal, se introdujo la transformación de la variable independiente, dada por su inversa $1/\text{distancia}$ (μm) (Fig. 3.4.3.B). Las pruebas de regresión lineal simple con la transformación de la variable, resultaron significativas ($p < 0,05$). En las Tablas de la figura 3.4.3, se muestran los valores del coeficiente de regresión, la ordenada al origen y el coeficiente de determinación R^2 ajustado, de la regresión recíproca, y la regresión lineal con la

transformación de la variable independiente, de ambos grupos lesionados, junto con sus intervalos de confianza obtenidos al 95%. La comparación entre los intervalos de confianza de los coeficientes de regresión de las curvas de CEL y EAL, resultó significativa ($p < 0,05$), con un coeficiente de regresión menor en el caso del grupo EAL, sugiriendo que el cambio medio (disminución) en la marcación ezrina-IR por cada aumento unitario de la distancia (franja) respecto a la lesión, es menor que en grupo CEL. No se detectaron diferencias significativas entre los intervalos de confianza de la constante y_0 .

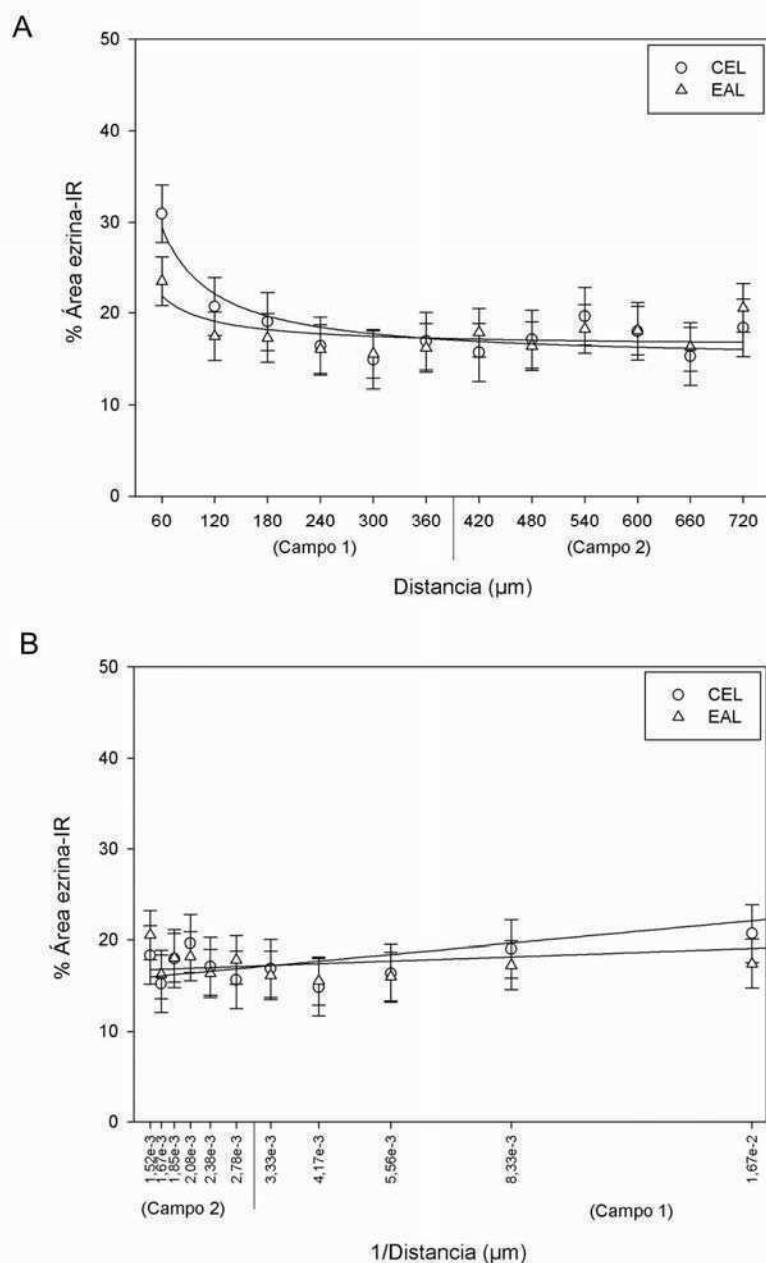


Tabla A. Regresión Recíproca de primer orden $\% \text{Área ezrina-IR} = y_0 + a(1/\text{Distancia})$

Grupo	a	IC _a (95%)	y ₀	IC _{y₀} (95%)	R ² ajustado
CEL	877,797	(607,675 — 1147,918)*	14,790	(13,164 — 16,416)	0,789
EAL	332,628	(85,591 — 579,665)*	16,334	(14,847 — 17,821)	0,362

*p<0,05

Tabla B. Regresión lineal simple con transformación de variable *Distancia*
 $\% \text{Área ezrina-IR} = y_0 + a.\text{Distancia}_T$, donde $\text{Distancia}_T = 1/\text{Distancia}$

Grupo	a	IC _a (95%)	y ₀	IC _{y₀} (95%)	R ² ajustado
CEL	877,797	(607,675 — 1147,918)*	14,790	(13,164 — 16,416)	0,789
EAL	332,628	(85,591 — 579,665)*	16,334	(14,847 — 17,821)	0,362

*p<0,05

Figura 3.4.3. Diagramas de dispersión de las medias ± 2 .EEM de la variable $\% \text{Área ezrina-IR}$ para cada valor de la variable *distancia* (μm). Se muestran las curvas de regresión en los grupos lesionados, donde se halló significancia en las pruebas. La *regresión lineal simple* dio no significativa en ambas condiciones de enriquecimiento. La relación entre las variables, se explica con una *función recíproca de primer orden* (Fig. A y Tabla A). Para ajustar los datos a una función lineal, se introdujo una transformación a la variable independiente, dada por su inversa $1/\text{distancia}$ (Fig.B y Tabla B). En las Tablas, se muestran los valores del coeficiente de regresión (a), la constante (y₀) y el coeficiente de determinación (R² ajustado), de los grupos lesionados, junto con sus intervalos de confianza (IC) obtenidos al 95%.

DISCUSIÓN

La exposición a una condición de *Enriquecimiento Ambiental (EA)* ha sido asociada al aumento del peso y el grosor de la corteza cerebral, al aumento del número de sinapsis, a cambios en la morfología celular, al aumento de la extensión del árbol dendrítico, a cambios en la disponibilidad y metabolismo de ciertos neurotransmisores y factores tróficos, y a la expresión de genes asociados a éstos, además del aumento de la tasa de neurogénesis en hipocampo (Van Praag y cols., 2000; Grossman y cols., 2002; 2003; Mohammed y cols., 2002).

Los estudios experimentales con enfoque cognitivo sobre la plasticidad cerebral – entendida como la modificación del neuropilo neural–, evidenciaron mejoras en pruebas de aprendizaje espacial y de memoria en ensayos de exposición a condiciones de EA (Grossman y cols., 2003; Mohammed y cols., 2002; Rosenzweig y Bennet, 1996).

Sin embargo, el concepto de plasticidad neural también es crítico para el desarrollo de estrategias de protección o reparación aplicables a eventos neurodegenerativos (Farah y cols., 2004). En los estudios realizados en este aspecto, los resultados de la exposición a EA luego de iniciado el daño, sostienen evidencias de que, en general, los efectos son favorables -y ciertamente reparativos-, como lo fundamentan pruebas de evaluación de habilidades cognitivas, previas y posteriores a la exposición, y correlatos neuroanatómicos y de estudios a nivel celular y molecular (Johansson, 1996; Johansson y Belichenko, 2002; Komitova y cols., 2002).

El rol estructural y funcional de la astrogliá en los procesos de plasticidad cerebral se encuentra en continuo desarrollo, y el paradigma de EA es un instrumento de suma utilidad para analizar tales procesos, así como para evaluar su potencial impacto en procesos reactivos gliales que ocurren luego de una lesión cortical, y desarrollar estrategias que favorezcan la regeneración o protección del tejido neural.

En el presente capítulo de Tesis se planteó investigar el rol del EA en la modulación de eventos de plasticidad de redes astrogiales en un modelo de reorganización tisular en roedores, luego de una lesión en la corteza cerebral visual. Se analizó el impacto del EA en el marco de su aplicación como agente *protector* o *preventivo* de los efectos astrogiales postlesionales.

Los resultados presentados en este estudio, evidencian que la exposición a la condición de EA previa a una lesión en la corteza visual, modula ciertos componentes de la reacción postlesional astrogial. Los efectos moduladores del EA se evidenciaron en proteínas astrogiales del citoesqueleto: GFAP –componente específico de los filamentos intermedios– y ezrina –componente de los procesos astrocíticos periféricos (*PAPs*) involucrados en las sinapsis y su regulación (Derouiche y Frotscher, 2001)–, ambos sumamente importantes para la función astrogial tanto en situaciones normales como patológicas.

La lesión del SNC y la perturbación de la barrera hematoencefálica con infiltración leucocitaria, disparan la liberación de moléculas (citoquinas proinflamatorias, radicales libres de oxígeno y nitrógeno, metabolitos, etc.), que actuando sinérgica o separadamente, causan la muerte neuronal secundaria (Kim y cols., 2006; Cui y cols., 2009). La muerte neuronal secundaria a la lesión y los componentes celulares y moleculares que la causan, contribuyen además a generar en la zona lesionada un ambiente no favorable para el crecimiento axonal, dado que la cicatriz glial podría significar un obstáculo para el restablecimiento de nuevas conexiones o para la restitución de las conexiones dañadas. (Johnson, 1993; Lanosa y Colombo, 2008). La cicatriz glial está formada principalmente por astrocitos y microglía reactivos, fibroblastos y matriz extracelular (Lindsay, 1986). Este fenómeno lleva o bien a la supervivencia neuronal o a su muerte, a la regeneración axonal o a su degeneración (Bähr y cols., 1994; Fawcett y Asher, 1999). Así, los astrocitos muestran simultáneamente aspectos favorables y

desfavorables como producto del balance entre imperativos inmediatos de supervivencia y la necesidad de restituir las funciones perdidas. Por lo tanto, la muerte neuronal secundaria posiblemente pueda controlarse con estrategias dirigidas a limitar la reactividad glial.

En el presente estudio, la lesión en la corteza visual de las ratas, indujo la típica reacción astrogliar GFAP-IR, con hipertrofia de soma y procesos celulares. Cabe destacar, que esta reacción observada correspondería a astrogliosis preexistente, dado que no se encontró incorporación de BrdU ni marcación de Ki-67 endógeno en estas zonas, por lo que la reacción astrogliar observada no pareciera involucrar proliferación de astrocitos. En relación a esta observación, la glia vimentina-IR (reactiva 'inmadura') sólo se encontró dentro de una distancia de 120 μm , mientras que la de GFAP-IR (reactiva madura), dentro de 400 μm . No se halló coincidencia entre esta zona de expresión de vimentina con la de proliferación (restringida a zona cicatricial). Por lo tanto, la observación de la expresión de vimentina en los astrocitos reactivos, puede ser indicativo de que estas células transcurrieron por un proceso de dediferenciación y no implicarían células inmaduras nuevas. Dado que la reacción glial vimentina-IR quedó circunscrita a los bordes de la lesión (véase Schiffer y cols., 1986), es posible que los tiempos experimentales (7 días postlesión) no hayan sido suficientes para que se desarrolle ampliamente, o alternativamente, que la astrogliosis vimentina-IR ya haya vuelto al estado maduro de expresión de GFAP. Cabe destacar, que no se encontraron efectos aparentes del EA sobre la marcación glial de vimentina.

Sin embargo, en el presente estudio, la astrogliosis reactiva postlesional GFAP-IR resultó significativamente menor en el grupo de animales que habían sido expuestos a EA en la etapa de desarrollo postnatal (i.e. desde los 21 días de edad hasta la adultez joven). Dado que los astrocitos fibrosos hipertróficos GFAP-IR que sobreviven luego de una lesión cortical, expresan proteoglicanos inhibidores de la iniciación, adhesión, crecimiento

y orientación de las neuritas (Bovolenta y cols.,1993; 1997; Nieto-Sampedro, 1999), se define una situación de equilibrio dinámico dual, entre eventos astrogliales favorables y desfavorables de la regeneración. La estrategia básica para favorecer la reparación funcional del SNC, podría ser la modificación de este equilibrio en favor de los procesos de regeneración del tejido cortical, en cuya modulación el EA parecería jugar un rol importante, según los resultados del presente estudio.

Aunque se halló efecto del EA en los animales lesionados, en este estudio no se detectó efecto del EA en la marcación GFAP-IR basal (animales intactos). Sin embargo cabe destacar los trabajos del grupo de investigación de Greenough, donde describieron que el EA indujo cambios en el tamaño y cantidad de astrocitos (Sirevaag y Greenough, 1987; 1991). Después de 30 días de exposición a EA –lo que equivale a los tiempos del presente estudio- detectaron un aumento en el tamaño medio de los astrocitos. Pero sólo luego de 67 días de exposición, detectaron un aumento en el número de astrocitos, tiempo que duplica el de nuestros experimentos. Además, detectaron que el volumen astrocítico por neurona en la corteza visual, aumentó en cantidad comparable con el incremento establecido previamente en la cantidad de sinapsis (Sirevaag y Greenough, 1985). Resultaría adaptativo, que cambios en los componentes ‘plásticos’ de las sinapsis neuronales, sean acompañados por cambios en los componentes ‘plásticos’ astrogliales.

Si bien, en el presente estudio no se hallaron cambios en la marcación GFAP-IR en los animales no lesionados, por efecto meramente de la exposición a EA, sí se detectaron cambios en la fracción de área ezrina-IR, lo cual da indicios claros de un aumento de esta proteína astrogliar que participa en la sinapsis (tripartita). Este componente de la ‘plasticidad astrogliar’ estaría siendo modulado por la exposición de los animales a las condiciones de EA, las cuales inducen cambios también en los componentes neuronales del neuropilo cortical, como se citó anteriormente. Estos resultados sugieren que el aumento de la inmunomarcación de ezrina en la astrogliar de la corteza visual de las ratas

expuestas a EA, pudo haber sido impulsado por la formación de nuevas sinapsis, o el refuerzo de la participación astrogliol en las sinapsis existentes (Jones y Greenough, 1996), o ambas situaciones. Para dilucidar este hecho sería necesario analizar marcadores sinápticos del componente neuronal y realizar estudios cuantitativos más detallados.

La lesión también indujo un aumento de la marcación de ezrina, lo que concuerda con el trabajo previo de Emirandetti y cols. (2006), cuyos resultados evidencian que ezrina aumenta en astrocitos reactivos. Sin embargo, cabe destacar, que en el grupo expuesto a EA y lesionado (EAL), la lesión disminuyó de manera significativa el aumento de la marcación de ezrina inducido por el EA, lo que se evidencia cuando se compara el nivel de marcación de este grupo con el de los animales no lesionados, pero expuestos a EA (EAI). Por lo tanto, estos resultados sugieren que el efecto de la lesión 'interfiere' con el efecto del EA sobre la expresión de ezrina, cuando ambos tratamientos se aplican juntos en el grupo experimental (grupo EAL; de hecho, la interacción ambiente*lesión resultó significativa). Sin embargo, cabría la interpretación de que tal efecto corresponda a una pérdida de tejido como consecuencia del daño. No obstante, los niveles de la marcación de ezrina en los animales lesionados expuestos a EA son equivalentes a los de los animales lesionados no expuestos (condición estándar), pero mayores a los niveles basales de marcación de ezrina en los animales no lesionados, por lo que no puede atribuirse esta disminución en la marcación a una pérdida de tejido a causa de la lesión cortical.

El efecto 'deletéreo' de la lesión sobre los niveles aumentados en la marcación de ezrina inducidos por el EA, puede tratarse de otro de los mecanismos compensatorios que se disparan tras el daño cerebral y que tienen impacto sobre la reorganización del neuropilo cortical. El daño desencadenaría respuestas primarias que podrían promover el reclutamiento de la astrogliá a estos sitios y su participación en el balance de procesos

reparativos-proinflamatorios y en la síntesis de factores de crecimiento, en detrimento momentáneo de su participación en la actividad sináptica –participación previamente reforzada por la exposición a condiciones de EA. De esta manera, los niveles de eozina se mantuvieron equivalentes a los del grupo lesionado, no expuesto previamente a EA.

El aumento postlesional en la concentración de aminoácidos excitatorios hasta niveles excitotóxicos y la subsecuente elevación en la concentración de Ca^{2+} intracelular, también formarían parte de los acontecimientos que llevan a la muerte neuronal secundaria (Tator y Fehlings, 1991). El rol del transportador astroglial de glutamato EAAT1 en este contexto postlesional, sería de suma importancia, dado que la astrogliía podría amortiguar el efecto citotóxico del glutamato, a través de su recaptación del medio extracelular (Beschoner y cols., 2007). Sin embargo, no se hallaron efectos del EA ni de la lesión en la inmunomarcación de EAAT1, en los tiempos experimentales del presente estudio. Tal vez, este tipo de modificaciones compensatorias ocurran a nivel funcional del transportador (Zagami y cols., 2005; van Landeghem y cols., 2006), o más a largo plazo de iniciado el daño cortical, no siendo suficientes los tiempos aplicados en este estudio para detectar un efecto en este aspecto astroglial.

CONCLUSIONES

El presente estudio propuso el análisis de eventos astrogliales estructurales y dinámicos asociados a los cambios sinápticos, y reactivos postlesionales, fundamentales para los procesos de reorganización del neuropilo de la corteza cerebral. Dadas las demandas fisiológicas de una corteza cerebral expuesta a EA y/o una lesión localizada, el neuropilo sufrió modificaciones en el componente astroglial, además de las modificaciones neuronales ya descritas por otros autores. La astrogliosis reactiva postlesional de tipo GFAP-IR resultó significativamente menor en el grupo de animales que habían sido expuestos a EA en la etapa de desarrollo postnatal, sugiriendo el impacto

favorable de esta condición sobre los procesos de reorganización postlesional, tendiendo a minimizar la reactividad astrogliar. Esta reacción GFAP-IR observada, correspondería a astrogliá preexistente, dado que no se encontraron indicios de proliferación (incorporación de BrdU o marcación de Ki-67 endógeno) de astroblastos en estas zonas.

Por otra parte, el aumento de la inmunomarcación de ezrina en la corteza visual de las ratas expuestas a EA, pudo haber sido impulsado por la formación de nuevas sinapsis, o el refuerzo de la participación astrogliar en las sinapsis ya existentes. La lesión ‘interfirió’ con este efecto del EA sobre la marcación de ezrina, cuando ambos tratamientos se aplicaron juntos en el grupo experimental.

Por lo tanto, estos resultados aportan al conocimiento de las bases que fundamentan las condiciones favorables del ‘ambiente circundante’ para el desarrollo cerebral postnatal de un individuo, que –según este estudio- tendrían impacto sobre el daño cerebral –si lo hubiera– y en la reactividad astrogliar postlesional, que en última instancia, influirían en la pérdida funcional consiguiente.

COMENTARIOS INTEGRADORES DE CAPITULOS

'La verdad en un tiempo es error en otro'

Montesquieu (1689-1755)

En esta sección, se presenta una propuesta de integración o asociación de los resultados obtenidos y expuestos en los capítulos de esta Tesis.

La evidencia clínica y experimental señala que los procesos de neuroregeneración y reorganización en el sistema nervioso central de mamíferos adultos, son limitados. Los procesos que se desencadenan luego de un daño al SNC pueden llevar a la supervivencia neuronal o a su muerte, a la regeneración axonal o a su degeneración. La existencia de un supuesto balance entre factores inductores y represores de los procesos de neurito- y sinaptogénesis, así como la discontinuidad estructural y funcional que representa la producción de una cicatriz en el parénquima nervioso, y los posibles roles de la astrogliá en los procesos de organización y reorganización del neuropilo, justifican el interés por profundizar el análisis de los procesos *reactivos astrogliales postlesionales* en el sistema nervioso central de mamíferos y desarrollar posibles estrategias basadas en la modulación de los mismos.

Lo expuesto en el párrafo anterior, sustenta el interés del presente proyecto de Tesis, el cual se centró en el análisis de la respuesta astrogliial subsiguiente al daño y de posibles variables modificadoras de dicha respuesta, en modelos *in vitro* e *in vivo*. Dadas las ventajas y limitaciones de ambos tipos de modelos, esta Tesis abarca distintos diseños experimentales, los cuales fueron planteados con el fin de evaluar y comparar ciertas características de las respuestas astrogliales postlesionales y su posible modulación por condiciones externas. Por tal motivo, la respuesta astrogliial a la lesión fue estudiada en contextos experimentales que pueden redefinirse sobre la base de los siguientes escenarios: I) *Astrogliá aislada*; II) *Astrogliá en presencia de otras células*; III) *Impacto a distancia* de la reactividad astrogliial; IV) Efecto del '*ambiente circundante*' sobre la respuesta astrogliial a la lesión.

Al respecto cabe incluir los siguientes comentarios generales. Por un lado, los modelos *in vitro* ofrecen la posibilidad de definir y controlar las variables en juego, de generar un diseño experimental que permita utilizar ciertas metodologías cuya aplicación está limitada en modelos *in vivo*, dada la complejidad del neuropilo *in situ*. Por otra parte, por su carácter inherente de *in vivo*, los modelos en primates y en roedores, ofrecen una visión más integrada del funcionamiento del neuropilo cortical frente a situaciones de daño inducido por lesiones quirúrgicas programadas, en los animales experimentales sujetos a condiciones controladas de laboratorio.

Escenario I: Astroglía aislada

La astroglía en este contexto (Capítulo I, sección 1) responde a una lesión local con proliferación celular, limitada al espacio local de la herida. Considerando esta característica de la respuesta *in vitro*, y que dicha característica fue compartida por otros tipos celulares no gliales (fibroblastos) en condiciones experimentales similares, los resultados observados sugieren que se trata de un evento relacionado con una pérdida transitoria de la inhibición por contacto del crecimiento celular, es decir, con el concepto de *interrupción/liberación de la inhibición por contacto*.

El concepto de inhibición por contacto celular se basa en el hecho de que las células que crecen *in vitro* adherentes a un sustrato, detienen su proliferación cuando se ponen en contacto luego de haber alcanzado la confluencia. En esta etapa, el cultivo puede mantenerse en un *estado estacionario dinámico*, equilibrado por procesos compensatorios de proliferación y muerte celular, basales. Una lesión inducida que abra una brecha en un cultivo confluyente, desencadenaría mecanismos de proliferación y reorganización, que tenderían a desplazar el cultivo a un nuevo estado estacionario.

Los procesos de señalización que dependen del contacto celular pueden distinguirse de aquellos que requieren una molécula difusible como intermediario (factor

de crecimiento, citoquina, hormona, por ejemplo, señalización parácrina). La señalización por contacto celular puede proceder con restricciones de localización y, por tanto, expresar más bien patrones discretos de comunicación, como la respuesta postlesional de proliferación celular limitada al espacio local de la herida, observada en el presente modelo estudiado.

Este fenómeno es considerado como uno de los más importantes mecanismos de regulación implicados en el desarrollo y el crecimiento del tejido, dado que –en condiciones sin lesión- la inhibición por contacto previene la proliferación celular descontrolada y asegura el desarrollo programado. En los tejidos maduros, incluyendo el cerebro, la inhibición por contacto celular ocurre continuamente y su pérdida está generalmente asociada con un estado de crecimiento anormal, como es el caso de los tumores o la inducción de factores de crecimiento subsiguiente a lesiones o enfermedades degenerativas. De este modo, ya sea directamente inducida por una lesión o indirectamente a través de cambios secundarios, los procesos de señalización por contacto célula-célula están necesariamente implicados en los procesos de reorganización postlesionales. Estos procesos implican que tras la interrupción del tejido a causa de la lesión, la inhibición por contacto entre las células vecinas desencadena procesos que tienden a restablecer las conexiones celulares. Una vez que el proceso de reparación se ha completado, la tasa de migración y proliferación celular se reestablecen en los tejidos una vez alcanzada una nueva condición estacionaria posterior a la lesión.

El fenómeno de interrupción de la inhibición por contacto celular probablemente participe en los eventos que tendrían lugar durante el proceso de reparación del neuropilo subsiguiente a una lesión. No obstante ello, los resultados presentados utilizando este modelo *in vitro* de ‘astroglía aslada’, pone de relieve la aparente carencia de factores celulares difusibles capaces de modificar en forma significativa la respuesta a una lesión, lo cual dista de la complejidad presente en condiciones *in vivo*.

Escenario II: Astrogliía en presencia de otras células

En los cultivos celulares mixtos (Capítulo I, sección 2), la respuesta proliferativa observada -predominantemente astrogliial-, depende de la densidad relativa de estas células respecto a otras células gliales, y es similar a la observada en cultivos enriquecidos en astrogliía, como se informó anteriormente.

Estudios previos de varios autores, sugieren la activación de la astrogliía por la microglía. Sin embargo, nuestros resultados muestran que las células de microglía no se asociaron con una respuesta proliferativa en los tiempos experimentales aplicados en este modelo *in vitro*. La falta de este tipo de respuesta de la microglía sugiere que el modelo actual no incluye las condiciones requeridas para que dicho proceso tenga lugar. Aunque la exploración de la expresión de marcadores de activación de microglía superó los objetivos propuestos originalmente en este estudio, es interesante señalar que se observaron características morfológicas de microglia reactiva, tal vez en relación a la activación microglial temprana (fase 1). Por lo tanto, la posibilidad de que la microglia reactiva, pero no proliferante, esté involucrada en las respuestas de incorporación de BrdU astrogliial, no pudo ser completamente descartada.

La ruptura de la barrera hematoencefálica está estrechamente relacionada con el desarrollo y la progresión de enfermedades del SNC, y es quizás un evento crucial en la regulación del microambiente del SNC tras una lesión. Por lo tanto, la falta de células sanguíneas, con características proinflamatorias y con capacidad para liberar citoquinas, podría ser considerada como unas de las causas de la falta de respuesta proliferativa de la microglía en nuestro modelo *in vitro*. Al respecto, las observaciones de la respuesta glial a una lesión quirúrgica en la corteza cerebral de primates no humanos (Capítulo II), o en roedores (Capítulo III), avalan esta diferencia entre los modelos de lesión *in vitro* e *in vivo*, estudiados en esta Tesis. En el primate lesionado, algunos núcleos BrdU-IR de la zona lesionada y perilesional, coincidieron con la marcación de IsolectinaB4, lo que

sugiere que estos núcleos podrían pertenecer a microglía en estadio 2 (proliferante) o 3 (macrofágica, que previamente fue de estadio 2, por lo que es BrdU-IR). Además, en este modelo, las células de la microglia presentaron morfología reactiva, (aparentemente en estadios 1, 2 y 3), en la lesión y zonas perilesionales, característica que sí fue hallada en el modelo de cultivos mixtos.

Como era de esperar, en los animales lesionados se hallaron astrocitos con características reactivas en las zonas de lesión y perilesional, en ambos modelos *in vivo*. La astrogliá GFAP-IR expresó las típicas características morfológicas reactivas, como mayor inmunoreactividad a GFAP, y engrosamiento del soma y procesos celulares, lo que no fue detectado en los modelos en cultivo estudiados.

Por otra parte, no se encontró astrogliá GFAP-IR –ni vimentina-IR– en fases proliferativas, ni en el sitio de lesión ni en la zona perilesional de los modelos *in vivo* (rata y primate) pero sí en los cultivos, como se expuso anteriormente, atribuida a la liberación de la inhibición por contacto de las células. De hecho, el tema de que los astrocitos GFAP-IR se dividan tras una lesión del SNC no está claramente dilucidado, existiendo controversias entre diversos estudios, si bien en la mayoría de ellos no se encontró proliferación astrogliá. Esta observación, concuerda con el concepto de que una célula ya diferenciada y madura en general no experimenta mitosis. Por lo tanto, varios investigadores han sugerido que *in vivo*, el aumento aparente de astrocitos reactivos se debe principalmente a la migración de las células cercanas, o a la adquisición postlesional de GFAP-IR en células residentes, ya sea por aumento de la expresión de GFAP o mayor disponibilidad de los epitopes de esta molécula frente a la detección con un anticuerpo específico. Esta característica se ve influenciada por la interacción de la astrogliá con las células circundantes, directa o indirectamente a través de cascadas de señalización con citoquinas específicas. En los modelos *in vitro*, sin embargo, los resultados sugieren que

la respuesta no fue inducida por una molécula difusible liberada luego de la lesión al cultivo.

De las observaciones y comentarios realizados surge que el rol de la barrera hematoencefálica y la interacción de las células proinflamatorias con la astrogliá, serían esenciales para el desarrollo de los procesos astrogliales reactivos.

Escenario III: Impacto a distancia

En los modelos en cultivo (Capítulo I) y en el modelo de lesión en roedores (Capítulo III), la proliferación (incorporación de BrdU e inmunomarcación de Ki-67 endógeno) se halló limitada en el espacio y localizada en la herida (cicatriz en el modelo *in vivo*), no superando una distancia de 200 μm . Sin embargo, en los primates (Capítulo II), una lesión focalizada de la corteza prefrontal o estriada, dio lugar a una respuesta de proliferación (incorporación nuclear de BrdU) tanto en sitios perilesionales como corticales distantes a la lesión, en estos últimos predominante en las láminas supragranulares de áreas corticales definidas, relacionadas funcionalmente con el sitio de lesión. Se propuso que este efecto se llevaría a cabo a través de conexiones cortico-corticales.

Si bien hay que considerar las diferencias interespecificas y metodológicas, es probable que las diferencias resultantes en cuanto al alcance de la reacción postlesional, entre la rata y el primate, sean producto de diferencias en la gravedad de la lesión. Las razones posibles de las diferencias en la reacción proliferativa, respecto a los cultivos celulares, ya fueron comentadas, y se expuso que la limitación espacial de la respuesta, pudo deberse a que en ese caso, el mecanismo preponderante implicado pudo haber sido la *interrupción de la inhibición por contacto celular*. Cabe agregar que en este modelo en cultivo, la magnitud de la respuesta de proliferación después de la lesión de cultivos enriquecidos en astrogliá, no dependió de la magnitud del daño (tamaño de la herida inducida). No obstante, en los modelos *in vivo*, mientras la lesión en los primates implicó

la sección de una lonja de tejido (4x4x2,5 mm) que fue retirada, en la rata la lesión fue menor, implicando un corte longitudinal más restringido (3x1mm)², lo que podría explicar en parte, las diferencias en el alcance de los efectos de la lesión en los niveles de proliferación que fueron analizados como incorporación nuclear de BrdU. Sin embargo, en ambos modelos *in vivo*, la reactividad astrogliar en términos de GFAP-IR, fue encontrada en los sitios de lesión y perilesionales, y no se encontraron células GFAP-IR con morfología reactiva en las regiones corticales remotas al sitio de lesión, en ambos modelos.

Dado que la mayoría de las investigaciones actuales, se centran en el estudio de los eventos localizados en el foco de la lesión, parece necesario insistir sobre el alcance de los efectos de una lesión cerebral, y su impacto en el neuropilo distante aparentemente no dañado, en el momento de desarrollar estrategias neuroquirúrgicas, y/o terapéuticas y de rehabilitación, que tiendan a minimizar el daño cerebral y favorecer la recuperación de la funcionalidad. En otras palabras, estas alteraciones del neuropilo cortical a distancia cobran particular relevancia para el *management* de pacientes con lesión cerebral.

Escenario IV: Efecto del ‘ambiente circundante’

En los modelos *in vitro* (Capítulo I), las perturbaciones del medio extracelular subsiguientes a la lesión -la turbulencia o su sustitución- no alteraron la respuesta astrogliar obtenida bajo condiciones de lesión, como tampoco lo hizo el tratamiento con un bloqueante de uniones *gap*. Vale agregar que esto sugiere que –en las condiciones experimentales descritas– la respuesta no dependería de una molécula liberada desde la lesión, difusible por medio extracelular o por uniones *gap*. Asimismo, la respuesta de proliferación astrogliar fue totalmente dependiente del suero, dado que la eliminación del suero del medio de cultivo, bloqueó esta respuesta postlesional.

² La lesión no se realizó igual en ambos modelos, porque la lonja de tejido que se retiró del primate se destinó a otros estudios experimentales, dado que en los casos de uso de primates en investigación es recomendable el análisis de más de un objetivo por razones obvias relativas a disponibilidad del material.

La interrupción de la barrera hematoencefálica en casos de lesiones cerebrales, libera hormonas y factores de crecimiento del suero, en el tejido nervioso, que inducirían proliferación de astrocitos y otras células gliales que contribuyen a la formación de la cicatriz en el foco de la lesión. De hecho, se ha señalado que la albúmina estimula la síntesis del ADN en astrocitos, lo que explicaría en parte la suero-dependencia de la respuesta postlesional descrita en estos modelos. Asimismo, la respuesta astrogliar a la lesión en un 'ambiente' establecido por la presencia de otros tipos gliales (en los cultivos mixtos) tampoco se vio modificada.

Por otra parte, en el modelo en rata expuesta a condiciones de enriquecimiento ambiental (EA) (Capítulo III), las demandas fisiológicas de una corteza cerebral expuesta a esta condición y/o a una lesión localizada, indujo modificaciones astrogliarales en el neuropilo de la corteza visual. La astrogliosis reactiva postlesional (GFAP-IR) resultó significativamente menor en el grupo de animales que habían sido expuestos a EA en la etapa de desarrollo postnatal, tendiendo a minimizar la reactividad astrogliar y sugiriendo el impacto favorable de esta condición sobre los procesos de reorganización postlesional. Esta reacción GFAP-IR observada, correspondería a astrogliar preexistente, dado que no se encontraron indicios de proliferación (incorporación de BrdU o marcación de Ki-67 endógeno) de astroblastos en estas zonas.

Dado que otros autores han descrito cambios en el componente neuronal del neuropilo a causa de la exposición a un ambiente enriquecido, resultaría adaptativo que estos cambios en los componentes 'plásticos' neuronales, sean acompañados por cambios en los componentes 'plásticos' astrogliarales. De hecho, en el presente estudio se detectaron cambios en la inmunomarcación de ezrina, lo cual da indicios claros de un aumento de esta proteína astrogliar que forma parte de los *procesos astrocíticos periféricos* (PAPs) que participan en la sinapsis (tripartita). Este componente de la 'plasticidad astrogliar' estaría siendo modulado por la exposición de los animales a las

condiciones de EA, las cuales inducen cambios también en los componentes neuronales del neuropilo cortical, como se citó anteriormente. Estos resultados sugieren que el aumento de la inmunomarcación de ezrina en la astrogliá de la corteza visual de las ratas expuestas a EA, pudo haber sido impulsado por la formación de nuevas sinapsis, o el refuerzo de la participación astrogliá en las sinapsis existentes. El efecto de la lesión en la disminución de ezrina en las ratas expuestas a un ambiente enriquecido –a niveles comparables a los observados en ratas lesionadas no expuestas a EA–, puede tratarse de otro de los mecanismos compensatorios que se disparan tras el daño cerebral y que tienen impacto sobre la reorganización del neuropilo cortical. La lesión podría promover el reclutamiento de la astrogliá a estos sitios y su participación en el balance de procesos reparativos-proinflamatorios y en la síntesis de factores de crecimiento, en detrimento parcial momentáneo de su participación en la actividad sináptica.

Por lo tanto, estos resultados aportan al conocimiento de las bases que fundamentan las condiciones favorables del ‘ambiente circundante’ para el desarrollo cerebral postnatal de un individuo, que –según este estudio- tendrían impacto sobre el daño cerebral –si lo hubiera– y en la reactividad astrogliá postlesional, y en última instancia, influirían en la pérdida funcional consiguiente. A diferencia de éstos, los resultados *in vitro* advierten una vez más sobre la necesidad de contextualizar las observaciones realizadas en tales condiciones, referidas al análisis de ciertos procesos astrogliá reactivos, y de elaborar modelos de complejidad celular más próximos a las condiciones *in situ*.

PERSPECTIVA FUTURA

'El más vigoroso tacto espiritual es la necesidad de persistencia en una forma u otra. El anhelo de extenderse en tiempo y en espacio'

Miguel de Unamuno (1864-1936)

Dado el rol estructural y funcional de la astrogliá en el *funcionamiento*, *mantenimiento* y *plasticidad* del neuropilo cerebral, resulta necesario incorporar este componente celular esencial, en los modelos experimentales sujetos a estudios morfológicos y/o funcionales. En particular, la existencia de *procesos astrocíticos periféricos* (PAPs) -ubicados junto a la hendidura sináptica-, constituirían un *microdominio* astroglial especializado, involucrado en la regulación de la transmisión sináptica ('sinapsis tripartita'). La implementación de metodologías que contribuyan a la detección o descripción de modificaciones en dichos procesos astrogliales especializados –en función de variables inductoras de cambios plásticos–, permitirá profundizar el estudio de la *plasticidad astroglial*, y a reconocerla como un componente necesario para los fenómenos de neuroplasticidad en forma integrada.

Indudablemente, es de particular interés, el análisis de la implicancia de la astrogliá en los procesos de organización normal y de reorganización postlesional del neuropilo. Por ello, surge la necesidad de regular los procesos gliales reactivos con el fin de reestablecer un ambiente funcional y regenerativo, como uno de los objetivos primarios para cualquier estrategia terapéutica. Para tal fin, es necesario profundizar en los estudios que permitan la identificación de la(s) vías (intra- extracelulares) y de las molécula(s) participantes como señales en tales procesos reactivos.

Por lo tanto, la dinámica y profundización de las investigaciones científicas en neurociencias –tanto básicas como aplicadas–, debería tornar ineludible considerar darle a la astrogliá –y la glia en general- el lugar de importancia que ocupa en la funcionalidad del sistema nervioso central.

APÉNDICE

Publicaciones que surgieron de este trabajo de tesis.

- Lanosa X, Colombo J. 2007. Astroglial injury in an ex vivo model: contributions to its analysis in enriched cell cultures. *In vitro Cell Dev. Anim.* 43, 186-195.
- Lanosa X., Colombo J. 2008. Cell contact-inhibition signaling as part of brain tissue wound-healing processes. *Neuron Glia Biology* 13, 1-8.
- Lanosa X, Reisin H, Santacroce I, Colombo J. 2008. Astroglía dye-coupling: an *in vitro* análisis of regional and interspecies differences in rodents and primates. *Brain Research* 1240, 82-86.
- Lanosa X, Santacroce I, Colombo J. Differential proliferative response between astroglía and microglia following *in vitro* injury of cerebral cortex primary cell cultures (**enviado**).
- Lanosa X, Yañez A, Alzugaray S, Colombo J. Local and remote cortical cellular responses following a surgical lesion in the *Cebus Apella* cerebral cortex. (**en redacción**).
- Lanosa X, Santacroce I, Colombo J. Postlesional astroglial key components from adult cerebral cortex are modulated by enriched environmental condition exposure of rats during their postnatal development. (**en redacción**).
- Lanosa X, Colombo J. Brain impacts, remote to local injury: a review focused on reorganization. (**en redacción**).

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

'La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el más comunicable'

Leonardo Da Vinci (1452-1519)

Por orden alfabético

Amat J, Ishiguro H, Nakamura K, Norton W. 1996. Phenotypic diversity and kinetics of proliferating microglia and astrocytes following cortical stab wounds. *Glia* 16, 368-382.

Bähr M, Bonhoeffer F. 1994. Perspectives on axonal regeneration in the mammalian CNS. *TINS* 17, 473-479.

Balasingam V, Tejada-Berges T, Wright E, Bouckova R, Yong V. 1994. Reactive astrogliosis in the Neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. *J. Neurosci.* 14, 846-856.

Berninger B, Costa M, Koch U, Schroeder T, Sutor B, Grothe B, Götz M. 2007. Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia. *J Neurosci.* 27, 8654-8664.

Beschorner R, Dietz K, Schauer N, Mittelbronn M, Schluesener HJ, Trautmann K, Meyermann R, Simon P. 2007. Expression of EAAT1 reflects a possible neuroprotective function of reactive astrocytes and activated microglia following human traumatic brain injury. *Histol Histopathol* 22, 515-526.

Bignami A, Dahl D. 1976. The astroglial response to stabbing. Immunofluorescence studies with antibodies to astrocyte-specific protein (GFA) in mammalian and submammalian vertebrates. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2, 99-110.

Bignami A, Raju T, Dahl D. 1982. Localization of vimentin, the non-specific intermediate filament protein, in embryonal glia and in early differentiating neurons. In vivo and in vitro immunofluorescence study of the rat embryo with vimentin and neurofilament antisera. *Dev. Biol.* 91, 286-295.

- Black J, Sirevaag A, Greenough W. 1987. Complex experience promotes capillary formation in young rat visual cortex. *Neurosci Lett* 83, 351-355.
- Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M. 1993. Characterization of a neurite outgrowth inhibitor expressed after CNS injury. *Eur J Neurosci* 5, 454-465.
- Bovolenta P, Fernaud-Espinosa I, Méndez-Otero R, Nieto-Sampedro M. 1997. Neurite outgrowth inhibitor of gliotic brain tissue. Mode of action and cellular localization, studied with specific monoclonal antibodies. *Eur J Neurosci* 9, 977-989.
- Bressler S. 1996. Interareal synchronization in the visual cortex. *Behavioral Brain Res.* 76, 37-49.
- Brodmann K. 1909. *Vergleichende Localisationslehre der Grosshirnrinde in thren Prinzipien Dargestellt auf Grund des Zellenbaues.* Leipzig, Germany: Barth.
- Campana D, Coustan-Smith E, Janossy G. 1988. Double and triple staining methods for studying the proliferative activity of human B and T lymphoid cells. *J Immunol Methods* 107, 79-88.
- Cheng G, Youssef BB, Markenscoff P, Zygorakis K. 2006. Cell population dynamics modulate the rates of tissue growth processes. *Biophys J* 90, 713-724.
- Chou R, Langan T. 2003. In vitro synchronization of mammalian astrocytic cultures by serum deprivation. *Brain Res Brain Res Protoc* 11, 162-167.
- Coller H, Sang L, Roberts J. 2006. A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol* 4, 329-349.

Codeluppi S, Norsted-gregory E, Wigerblad C, Kjell J, Olson I, Svensson C. In vitro model for the study of adult spinal cord reactive astrocytes. Program Nro. 357.14. 2010. Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, 2010. Online.

Coe C, Savage A, Bromley L. 1992. Phylogenetic influences on hormone levels across the primate order. *Am. J. Primatol.* 28, 81-100.

Colombo J. 2001. A columnar - supporting mode of astroglial architecture in the cerebral cortex of adult primates? *Neurobiology* 9, 1-16.

Colombo J. 2005. Glutamate uptake by rat brain astroglia incubated in human cerebrospinal fluid. *Med Sci Monit.* 11, 13-7.

Colombo J, Fuchs E, Härtig W, Marotte L, Puissant V. 2000. "Rodent-like" and "primate-like" types of astroglial architecture in the adult cerebral cortex of mammals: a comparative study. *Anat Embryol* 201, 111-120.

Colombo J, Härtig W, Lipina S, Bons N. 1998. Astroglial interlaminar processes in the cerebral cortex of prosimians and Old World monkeys. *Anat Embryol* 197, 369-376.

Colombo J, Lipina S, Yáñez A, Puissant V. 1997b. Postnatal development of interlaminar astroglial processes in the cerebral cortex of primates. *Int. J. Dev. Neurosci.* 15, 823-833.

Colombo J, Reisin H. 2004. Interlaminar astroglia of the cerebral cortex: a marker of the primate brain. *Brain Res.* 1006,126-131.

Colombo J, Reisin H, Jones M, Bentham C. 2005. Development of human interlaminar astroglial processes in the cerebral cortex of control and Down's Syndrome cases. *Exp. Neurol.* 193, 207-217.

- Colombo J, Schleicher A, Zilles K. 1999. Patterned distribution of immunoreactive astroglial processes in the striate (V1) cortex of New World monkeys. *Glia* 25, 85-92.
- Colombo J, Yáñez A, Lipina S. 1997. Interlaminar astroglial processes in the cerebral cortex of non-human primates: response to injury. *Brain Res.* 38, 503-512.
- Colombo J, Yáñez A, Puissant V, Lipina S. 1995. Long, interlaminar astroglial cell processes in the cortex of adult monkeys. *J Neurosci Res.* 40, 551-556.
- Cui Q, Yin Y, Benowitz L. 2009. The role of macrophages in optic nerve regeneration. *Neuroscience* 158, 1039-1048.
- Dahl D, Rueger D, Bignami A, Weber K, Osborn M. 1981. Vimentin, the 57,000 molecular weight protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeletal component in immature glia. *Eur. J. Cell Biol.* 24, 191-196.
- Dávalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim J, Zuo Y, Jung S, Littman D, Dustin M, Gan W. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8, 752-758.
- Dermietzel R, Spray D. From neuro-glue ('Nervenkitt') to glia: a prologue. 1998. *Glia* 24, 1-7.
- Derouiche A, Frotscher M. 2001. Peripheral astrocyte processes: monitoring by selective immunostaining for the actin-binding ERM proteins. *Glia* 36, 330-341.
- Eclancher F, Kehrl P, Labourdette G, Sensenbrenner M. 1996. Basic fibroblast growth factor (bFGF) injection activates the glial reaction in the injured adult rat brain. *Brain Res* 737, 201-214.

Emirandetti A, Zanon R, Sabha M, Rodrigues de Olivera A. 2006. Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy. *Brain Res* 1095, 35-42.

Eng L, Ghirnikar R. 1994. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.* 4, 229-237.

Eng L, Vanderhaeghen J, Bignami A, Gersh B. 1971. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* 28, 351-354

Faber-Elman A, Solomon A, Abraham JA, Marikovsky M, Schwartz M. 1996. Involvement of wound-associated factors in rat brain astrocyte migratory response to axonal injury: in vitro stimulation. *J Clin Invest* 97, 162-171.

Farah M, Illes J, Cook-Deegan R, Gardner H, Kandel E, King P, Parens E, Sahakian B, Wolpe P. 2004. Neurocognitive enhancement: what can we do and what should we do? *Nat Rev Neurosci* 5, 421-425.

Fawcett J, Asher R. 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 46, 377–391.

Fetler L, Amigorena S. 2005. Brain under surveillance: The microglia patrol. *Science* 309, 392-393.

Fiorani M. Jr, Gattass R, Rosa M, Sousa A. 1989. Visual area MT in the *Cebus* monkey: location, visuotopic organization, and variability. *J. Comp. Neurol.* 287, 98-118.

Fisher B, Petzinger G, Nixon K, Hogg E, Bremner S, Mwshul C, Jakowec M. 2004. Exercise-induced behavioral recovery and neuroplasticity in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse basal ganglia. *J Neurosci Res* 77, 378-390.

Franke H, Krugel U, Illes P. 1999. P2 receptor-mediated proliferative effects on astrocytes in vivo. *Glia* 28, 190-200.

Gayol S, Pannicke T, Reichenbach A, Colombo J. 1999. Cell-cell coupling in cultures of striatal and cortical astrocytes of the monkey *Cebus apella*. *J Hirnforsch* 39, 473-479.

Geiger K, Stoldt P, Schlote W, Derouiche A. 2000. Ezrin immunoreactivity is associated with increasing malignancy of astrocytic tumors but is absent in oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 157, 1785-1793.

Ghirnikar R, Yu A, Eng L. 1994. Astrogliosis in culture: III. Effect of recombinant retrovirus expressing antisense glial fibrillary acidic protein RNA. *J Neurosci Res* 38, 376-385.

Giaume Ch, McCarthy K. 1996. Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *TINS* 19, 319-325.

Giulian D, Lachman L. 1985. Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science* 228, 497-499.

Gould E, Gross C. 2002. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J. Neurosci.* 22, 619-623.

Gould E, Reeves A, Graziano M, Gross C. 1999. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286, 548-552.

Gould E, Tanapat P, McEwen B, Flügge G, Fuchs E. 1998. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 3168-3171.

Gould E, Vail N, Wagers M, Gross C. 2001. Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10910-10917.

Grossman A, Churchill J, Bates K, Kleim J, Greenough W. 2002. A brain adaptation view of plasticity: is synaptic plasticity an overly limited concept? *Prog Brain Res* 138, 91-108.

Grossman A, Churchill J, McKinney B, Kodish I, Otte S, Greenough W. 2003. Experience effects on brain development: possible contributions to psychopathology. *J Child Psychol Psychiatry* 44, 33-63.

Hampton D, Rhodes K, Zhao C, Franklin R, Fawcett J. 2004. The responses of oligodendrocyte precursor cells, astrocytes and microglia to a cortical stab injury, in the brain. *Neuroscience* 127, 813-820.

Hassinger T, Guthrie P, Atkinson P, Bennett M, Kater S. 1996. An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13268-13273.

Hayes O, Ramos B, Rodriguez LL, Aguilar A, Badia T, Castro FO. 2005. Cell confluency is as efficient as serum starvation for inducing arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle in granulose and fibroblast cells of cattle. *Anim Reprod Sci* 87, 181-192.

Hilbe J. 2007. *Negative binomial regression*. Cambridge University Press.

Hindley S, Herman M, Rathbone M. 1994. Stimulation of reactive astrogliosis in vivo by extracellular adenosine diphosphate or an adenosine A₂ receptor agonist. *J Neurosci Res* 38, 399-406.

Hodges-Savola Ch, Rogers S, Chilardi J, Timm D, Mantyh P. 1996. β -Adrenergic receptors regulate astrogliosis and cell proliferation in the central nervous system in vivo. *Glia* 17, 52-62.

Howard V, Reed M. 2005. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy, Advanced Methods*, 2nd Ed. Garland Science/BIOS Scientific Publishers.

Hossain M, Peeling J, Sutherland G, Hertzberg E, Nagy J. 1994. Ischemia-Induced cellular redistribution of astrocytic gap junctional protein connexin43 in rat brain. *Brain Res* 652, 311-322.

Hou Y, Yu A, Garcia J, Aotaki-Keen A, Lee Y, Eng L, Hjelmeland L, Menon V. 1995. Astrogliosis in culture. IV. Effects of basic fibroblast growth factor. *J Neurosci Res* 40, 359-370.

Johansson B, Belichenko P. 2002. Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. *J Cerebral Blood Flow Metabolism* 22, 89-96.

Johansson B. 1996. Functional outcome in rats transferred to an enriched environment 15 days after focal brain ischemia. *Stroke* 27, 324-326.

Johnson A. 1993. Contact inhibition in the failure of mammalian CNS axonal regeneration. *Bioessays* 15, 807-813.

Jones L, Yamaguchi Y, Stallcup W, Tuszynski M. 2002. NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J. Neurosci.* 22, 2792–2803.

- Jones T, Greenough W. 1996. Ultrastructural evidence for increased contact between astrocytes and synapses in rats reared in a complex environment. *Neurobiol Learn Memory* 65, 48-56.
- Kee N, Sivalingam S, Boostra R, Wojtowicz J. 2002. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J. Neurosci. Methods* 115, 97-105.
- Kim J, Kim J, Park J, Lee S, Kim W, Yu Y, Kim K. 2006. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39, 339-345.
- Koketsu D, Mikami A, Miyamoto Y, Hisatsune T. 2003. Nonrenewal of neurons in the cerebral neocortex of adult macaque monkeys. *J. Neurosci.* 23, 937-942.
- Komitova M, Perfilieva E, Mattsson B, Eriksson P, Johansson B. 2002. Effects of cortical ischemia and postischemic environmental enrichment on hippocampal cell genesis and differentiation in the adult rat. *J Cerebral Blood Flow Metabolism* 22, 852-860.
- Kornack D, Rakic P. 1999. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of adult macaque monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5768-5773.
- Környei Z, Czirók A, Vicsek T, Madarász E. 2000. Proliferative and migratory responses of astrocytes to in vitro injury. *J Neurosci Res* 61, 421-429.
- Lahoz M, Nagle C, Porta M, Farinati Z, Manssur T. 2006. Cortisol response and ovarian hormones in juvenile and cycling female *Cebus* monkeys: effect of stress and dexamethasone. *Am. J. Primatol.* 69, 551 – 561.
- Landis M. 1994. The early reactions of non-neuronal cells to brain injury. *Annu Rev Neurosci* 17, 133-151.

Lanosa X, Colombo J. 2007. Astroglial injury in an ex vivo model: contributions to its analysis in enriched cell cultures. *In vitro Cell Dev. Anim.* 43, 186-195.

Lanosa X., Colombo J. 2008. Cell contact-inhibition signaling as part of brain tissue wound-healing processes. *Neuron Glia Biology* 13, 1-8.

Lanosa X, Reisin H, Santacroce I, Colombo J. 2008. Astroglía dye-coupling: an *in vitro* análisis of regional and interspecies differences in rodents and primates. *Brain Research* 1240, 82-86.

Levenberg S, Yarden A, Kam Z, Geiger B. 1999. p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry. *Oncogene* 18, 869-876.

Levine J. 1994. Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain Injury. *J. Neurosci.* 14, 4716-4730.

Lin J, Weigel H, Cotrina M, Liu S, Bueno E, Hansen A, Hansen T, Goldman S, Nedegaard M. 1998. Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nature Neurosci* 1, 494-500.

Lindsay. 1986. Reactive gliosis. In *Astrocytes*, vol 3, pp 231-262.

Lipina S, Colombo J. 2007. Premorbid exercising in specific cognitive tasks prevents impairment of performance in parkinsonian monkeys. *Brain Res* 1134, 180-186.

Lippert-Gruener M, Maegele M, Garbe J, Angelov D. 2007. Late effects of enriched environment (EE) plus multimodal early onset stimulation (MEOS) after traumatic brain injury in rats: Ongoing improvement of neuromotor function despite sustained volume of the CNS lesion. *Exp Neurol* 203, 82-94.

- Louw D, Masada T, Sutherland G. 1998. Ischemic neuronal injury is ameliorated by astrocyte activation. *Can J Neurol Sci* 25, 102-107.
- Mandell J, Gocan N, Vandenberg S. 2001. Mechanical trauma induces rapid astroglial activation of ERK/MAP kinase: evidence for a paracrine signal. *Glia* 34, 283-295.
- Manocha S, Shantha T, Bourne G. 1968. A stereotaxic atlas of the brain of Cebus monkey (*Cebus apella*). Oxford University Press.
- Matthews M, Powell T. 1960. Transneuronal cell degeneration in the lateral geniculate nucleus of the rhesus monkey. *J. Anat.* 94, 145-169.
- McCarthy K, de Vellis J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol.* 85, 890-902.
- McMillan M, Thai L, Hong J, O'Callaghan J, Pennypacker K. 1994. Brain injury in a dish: a model for reactive gliosis. *TINS* 17, 138-142.
- Miguel-Hidalgo J, Waltzer R, Whittom A, Austin M, Rajkowska G, Stockmeier C. 2010. Glial and glutamatergic markers in depression, alcoholism, and their comorbidity. *J Affect Disord* 127, 230-240.
- Miyake T, Hattori T, Fukuda M, Kitamura T, Fijita S. 1988. Quantitative studies on proliferative changes of reactive astrocytes in mouse cerebral cortex. *Brain Res.* 451, 133-138.
- Mohammed A, Zhu S, Darmopil S, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, Diamond M, Eriksson P, Bogdanovic N. 2002. Environmental enrichment and the brain. *Prog Brain Res* 138, 109-133.

- Mukhin A, Ivanova S, Allen J, Faden A. 1998. Mechanical injury to neuronal/glia cultures in microplates: role of NMDA receptors and pH in secondary neuronal death. *J Neurosci Res* 51, 748-758.
- Mullen R, Buck Ch, Smith A. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201-211.
- Nadal A, Fuentes E, Pastor J, McNaughton P. 1995. Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1426-1430.
- Nakatsuji Y, Miller R. 1998. Homotypic cell contact-dependent inhibition of astrocyte proliferation. *Glia* 22, 379-389.
- Napp M, Colombo J. 2000. Heterochronous maturation of regional brain astroglia: neuronal modulation of striatal glial cells differentiation ex vivo. *Int J Dev Neurosci*. 18, 531-544.
- Nathaniel E, Nathaniel D. 1981. The reactive astrocyte. In: *Advances in cellular neurobiology*. Academic Press, vol. 2, pp 249-301.
- Newman E. 1986. High potassium conductance in astrocyte endfeet. *Science* 233, 453-454.
- Nieto-Sampedro M. 1999. Neurite outgrowth inhibitors in gliotic tissue. *Adv Exp Med Biol* 468, 207-224.
- Norenberg M. 1994. Astrocyte responses to CNS injury. *J Neuropath and Exp Neurol* 53, 213-220.

Norton W, Aquino D, Hozumi I, Chiu F, Brosnan C. 1992. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem. Res.* 17, 877-885.

Nowakowski R, Hayes N. 2000. New neurons: extraordinary evidence or extraordinary conclusion?. *Science* 288, 771a.

Oberheim N, Wang X, Goldman S, Nedergaard M. 2006. Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci.* 29, 547–553.

Ochalski P, Sawchuk M, Hertzberg E, Nagy J. 1995. Astrocytic gap junction removal, connexin 43 redistribution, and epitope masking at excitatory amino acid lesion sites in rat brain. *Glia* 14, 279-294.

Oh Y, Markelonis G, Oh T. 1993. Effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor α on the expression of glial fibrillary acidic protein and transferrin in cultured astrocytes. *Glia* 8, 77-86.

Paxinos G, Watson C. 1982. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press.

Peters A, Sethares C. 2004. Oligodendrocytes, their progenitors and other neuroglial cells in the aging primate cerebral cortex. *Cereb Cortex* 14, 995-1007.

Pforte C, Henrich-Noack P, Baldauf K, Reymann K. 2005. Increase in proliferation and gliogenesis but decrease of early neurogenesis in the rat forebrain shortly after transient global ischemia. *Neurosci* 136, 1133-1146.

Pons T, Garraghty P, Ommaya A, Kaas J, Taub E, Mishkin M. 1991. Massive cortical reorganization after sensory differentiation in adult macaques. *Science* 252, 1857-1860

Privat A. 2003. Astrocytes as support for axonal regeneration in the central nervous system of mammals. *Glia.* 43, 91-93.

Raivich G, Bohatschek M, Kloss C, Werner A, Jones LL, Kreutzberg G. 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 30, 77-105.

Rakic P. 2002. Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J. Neurosci.* 22, 614-618.

Rathbone M, Middlemiss P, Andrew C, Caciagli F, Ciccarelli R, Di Iorio P, Huang R. 1998. The trophic effects of purines and purinergic signaling in pathologic reactions of astrocytes. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12, S36-S45.

Reisin H, Colombo J. 2004. Glial changes in primate cerebral cortex following long-term sensory deprivation. *Brain Res* 1000, 179-182.

Richard F. Morton and J. Richard Hebel. 1985. *A Study Guide To Epidemiology and Biostatistics.* University Park Press.

Ridet J, Malhotra S, Privat A, Gage F. 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *TINS* 20, 570-576.

Robertson I, Murre J. 1999. Rehabilitation of brain damage: brain plasticity and principles of guided recovery. *Psych Bull* 125, 544-575.

Rockland K, Pandya D. 1979. Laminar origins and terminations of cortical connections of the occipital lobe in the Rhesus monkey. *Brain Res.* 179, 3-20.

Röhl C, Lucius R, Sievers J. 2007. The effect of activated microglia on astrogliosis parameters in astrocyte cultures. *Brain Res.* 1129, 43–52.

Roitbak T, Syková E. 1999. Diffusion barriers evoked in rat cortex by reactive astrogliosis. *Glia* 28, 40-48.

Rosenzweig M, Bennett E. 1996. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res* 78, 57-65.

Roth S, Zhang S, Chiu J, Wirth E, Schweizer U. 2010. Development of a serum-free supplement for primary neuron culture reveals the interplay of selenium and vitamin E in neuronal survival. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 24, 130-137.

Salin P, Bullier J. 1995. Cortico-cortical connections in the visual system: structure and function. *Physiol. Rev.* 75, 107-154.

Sanal N, Tramontin A, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro N, Gupta N, Kunwar S, Lawton M, McDermott M, Parsa A, Manuel-García Verdugo J, Berger M, Alvarez-Buylla A. 2004. Unique astrocyte ribbon in adult human contains neural stem cell but lack chain migration. *Nature* 427, 740-744.

Saura J. 2007. Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *J. Neuroinflammation* 4, 26.

Schutte B, Reynders M, Bosman F, Blijham G. 1987. Effect of tissue fixation on anti-bromodeoxyuridine immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 35, 1343-1345.

Schwartz M, Goldman-Rakic P. 1982. Single cortical neurons have axon collaterals to ipsilateral and contralateral cortex in fetal and adult primates. *Nature* 299, 154-155.

Sirevaag A, Greenough W. 1985. Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. II. Synaptic morphometry. *Brain Res* 351, 215-226.

Sirevaag A, Greenough W. 1987. Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. III. Neuronal and glial nuclei, boutons, dendrites, and capillaries. *Brain Res* 424, 320-332.

- Sirevaag A, Greenough W. 1991. Plasticity of GFAP-immunoreactive astrocyte size and number in visual cortex of rats reared in complex environments. *Brain Res* 540, 273-278.
- Sivron T, Schwartz M. 1995. Glial cell types, lineages, and response to injury in rat and fish: implications for regeneration. *Glia* 13, 157-165.
- Skoff R. 1975. The fine structure of pulse labeled (3-H-thymidine cells) in degenerating rat optic nerve. *J Comp Neurol* 161, 595-611.
- Soler C, Grangeasse C, Baggetto L, Damour O. 1999. Dermal fibroblast proliferation is improved by beta-catenin overexpression and inhibited by E-cadherin expression. *FEBS Lett* 442, 178-182.
- Spalding K, Bhardwaj R, Buchholz B, Druid H, Frisén J. 2005. Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell* 122, 133-143.
- Stallcup W. 2002. The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J. Neurocytol.* 31, 423-435.
- Takano T, Oberheim N, Cotrina M, Nedergaard M. 2009. Astrocytes and ischemic injury. *Stroke* 40, S8-12.
- Tan A, Zhang W, Levine J. 2005. NG2: a component of the glial scar that inhibits axon growth. *J. Anat.* 207, 717-725.
- Tator C, Fehlings M. 1991. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 75, 15-26.
- Van Landeghem F, Weiss T, Oehmichen M, Von Deimling A. 2006. Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 23, 1518-1528.

- Van Praag H, Kempermann G, Gage F. 2000. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1, 191-198.
- Watanabe M, Toyama Y, Nishiyama A. 2002. Differentiation of proliferated NG2-positive glial progenitor cells in a remyelinating lesion. *J. Neurosci. Res.* 69, 826-836.
- Wang K, Bekar L, Furber K, Walz W. 2004. Vimentin-expressing proximal reactive astrocytes correlate with migration rather than proliferation following focal brain injury. *Brain Res* 1024, 193-202.
- Weiloch T, Nikolich K. 2006. Mechanisms of neural plasticity following brain injury. *Curr Opinon Neurobiol* 16, 258-264.
- Wilkin G, Marriott D, Cholewinski A. 1990. Astrocyte heterogeneity. *TINS* 13, 43-46.
- Will B, Rosenzweig M, Bennett E, Hebert M, Morimoto H. 1977. Relatively brief environmental enrichment aids recovery of learning capacity and alters brain measures after postweaning brain lesions in rats. *J Comp Physiol Psych* 91, 33-50.
- Winocur G, Moscovitch M, Fogel S, Rosenbaum R, Sekeres M. 2005. Preserved spatial memory after hippocampal lesions: effects of extensive experience in a complex environment. *Nat Neurosci* 8, 273-275.
- Wu V, Schwartz J. 1998. Cell culture models for reactive gliosis: new perspectives. *J Neurosci Res* 51, 675-681.
- Xerri C, Zennou-Azogui Y. 2003. Influence of the postlesion environment and chronic piracetam treatment on the organization of the somatotopic map in the rat primary somatosensory cortex after focal cortical injury. *Neurosci* 118, 161-177.

Yong V, Moudjian R, Yong F, Ruijs T, Freedman M, Cashman N, Antel J. 1991. Gamma-interferon promotes proliferation of adult human astrocytes in vitro and reactive gliosis in the adult mouse brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7016-7020.

Yu A, Lee Y, Eng L. 1993. Astrogliosis in culture: I. The model and the effect of antisense oligonucleotides on glial fibrillary acidic protein synthesis. *J Neurosci Res* 34, 295-303.

Zagami C, O'Shea R, Lau C, Cheema S, Beart P. 2005. Regulation of glutamate transporters in astrocytes: evidence for a relationship between transporter expression and astrocytic phenotype. *Neurotox Res* 7, 143-109.

Zegers M, Forget M, Chernoff J, Mostov K, ter Beest M, Hansen S. 2003. Pak1 and PIX regulate contact inhibition during epithelial wound healing. *EMBO J* 22, 4155-4165.