

Caracterización de la neurogénesis maladaptativa y el deterioro cognitivo post-ictus en un modelo experimental de isquemia cerebral inducida mediante cloruro férrico en ratón

Paula Villatoro González^{1,2*}, Francisco Javier de Castro^{2,3}, Alicia García-Culebras^{2,3}, María Isabel Cuartero^{2,3}, María Ángeles Moro^{2,3,4}

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. paulavg45@gmail.com. 2 Centro Nacional para las Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Madrid, España. 3 Unidad de Investigación Neurovascular, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, España. 4 Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (iC12), Madrid, España

Resumen

El ictus isquémico es considerado una de las principales causas de demencia y discapacidad en el mundo. La neurogénesis hipocampal que ocurre tras ictus en diversos modelos experimentales de la enfermedad se ha asociado previamente al deterioro cognitivo a largo plazo. Sin embargo, dada la alta heterogeneidad de la patología es necesario estudiar la respuesta neurogénica en nuevos modelos experimentales de ictus isquémico. El objetivo de este estudio fue caracterizar la respuesta neurogénica hipocampal adulta y su relación con el deterioro cognitivo post-ictus en un modelo experimental de isquemia cerebral permanente por cloruro férrico en ratón. Se llevó a cabo la evaluación de la lesión en fase aguda y crónica tras la isquemia a través de imagen por resonancia magnética. Adicionalmente, se evaluó la respuesta neurogénica hipocampal tras isquemia mediante inmunofluorescencia, así como el deterioro cognitivo mediante pruebas de comportamiento. Nuestros resultados muestran que el modelo de isquemia por cloruro férrico produce atrofia e hipoperfusión cortical y no afecta directamente al hipocampo. Además, el modelo de isquemia estudiado resulta en un aumento de la neurogénesis hipocampal tras la isquemia. Concretamente, demostramos un incremento de neuroblastos y neuronas inmaduras en la zona subgranular del giro dentado 7 días tras la isquemia. Asimismo, nuestros resultados muestran que este modelo resulta en un aumento del número de nuevas neuronas con morfología aberrante en ambos hemisferios del cerebro. Además, observamos que parte de los animales desarrollan déficit cognitivo a largo plazo. Los resultados preliminares presentados en este estudio sugieren que el ictus isquémico inducido por cloruro férrico es un modelo experimental adecuado para el estudio de la neurogénesis hipocampal adulta y el deterioro cognitivo post-ictus.

Palabras clave: ictus; isquemia; neurogénesis; cloruro férrico

Recibido: 1 de septiembre de 2022 A incluir en la edición del artículo

Copyright: © 2022 Paula Villatoro González et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional.
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

*E-mail: paulavg45@gmail.com



Introducción

Deterioro cognitivo y demencia vascular asociados al ictus isquémico: definición y epidemiología

Se define como ictus a la aparición súbita de trastornos de la función cerebral, con síntomas que duran más de 24 horas, sin otra causa aparente que un origen vascular [1]. Según la Organización Mundial del Ictus (WSO), esta enfermedad afecta a 12.2 millones de personas al año y es la segunda causa de mortalidad en el mundo, con 6.6 millones de muertes anuales. El ictus isquémico, que representa el 87% de casos de ictus a nivel global, se caracteriza por la obstrucción mecánica de un vaso sanguíneo que irriga el cerebro, generando una reducción parcial o completa del flujo sanguíneo en una zona localizada del cerebro sin que se produzca la ruptura de dicho vaso [2, 3]. Actualmente, los tratamientos para ictus isquémico incluyen trombólisis intravenosa y trombectomía endovascular, los cuales se basan en eliminar el coágulo de manera farmacológica, con activador tisular del plasminógeno, o mecánica respectivamente. Estos tratamientos, junto con los esfuerzos en prevención y monitorización de los pacientes en fase aguda, han propiciado una disminución en la mortalidad asociada al ictus [4]. Como consecuencia, el ictus no es solo una de las principales causas de muerte a nivel mundial, sino que, además, es una de las principales causas de demencia y deterioro cognitivo de origen vascular. De hecho, según estudios previos, más de la mitad de pacientes que han sufrido un ictus presentan alguna forma de deterioro cognitivo y discapacidad, donde dos tercios corresponden a deterioro cognitivo moderado y un tercio a uno severo [5, 6]. Este deterioro incluye alteraciones de la memoria, del lenguaje, la orientación y funciones motoras. Es por ello que esta patología se considera una de las principales causas de demencia y discapacidad a nivel mundial [4].

Papel de la neurogénesis hipocampal en el desarrollo del deterioro cognitivo y la demencia tras ictus

Tras un ictus isquémico, el cerebro pone en marcha una serie de mecanismos de neuroreparación con el fin de atenuar los efectos del daño. Entre estos mecanismos se encuentra, por ejemplo, los procesos de plasticidad sináptica, la angiogénesis y la neurogénesis. De hecho, tras un ictus isquémico se produce un aumento en la proliferación de células precursoras en los dos nichos neurogénicos del cerebro adulto: la zona subgranular o ZSG del giro dentado (GD) del hipocampo y la zona subventricular o ZSV [7]. En los nichos neurogénicos, las células progenitoras neurales dan lugar a las células progenitoras amplificadoras transitorias. Estas finalmente dan lugar a los neuroblastos y neuronas inmaduras, que se caracterizan por expresar la proteína doblecortina (DCX) y luego se diferencian a neuronas maduras. En condiciones fisiológicas, las neuronas de la ZSV migran hacia el bulbo olfatorio por la ruta migratoria rostral [7]. Sin embargo, tras un ictus, los neuroblastos de la ZSV se desvían de forma ectópica hacia la zona infartada a través del cuerpo calloso en donde se cree que contribuyen a la generación de nuevas neuronas y/o promueven la secreción de factores tróficos para incrementar la recuperación del tejido y la supervivencia neuronal. Sin embargo, las neuronas de la ZSG tras el ictus no sufren migración ectópica como la ZSV, y migrarán hacia la capa granular o CG del GD donde se integrarán en redes neuronales pre-existentes, participando en funciones de memoria y aprendizaje [8, 9].

Recientemente se ha demostrado que una fracción significativa de las nuevas neuronas que se generan tras ictus muestran una morfología aberrante [10]. Por lo tanto, el ictus impactaría negativamente en la neurogénesis hipocampal adulta y resultaría en alteraciones de la memoria dependiente del hipocampo. De hecho, estudios recientes de nuestro grupo han determinado que tras un modelo cortical de ictus isquémico generado por oclusión de la arteria cerebral media y la arteria carótida común, parte de los ratones desarrollan deterioro a largo plazo que afecta la memoria contextual y espacial dependiente del hipocampo. Además, este deterioro cognitivo estaba asociado a una fuerte respuesta neurogénica bilateral, que daba lugar a nuevas neuronas con morfología aberrante que resultaban en la distorsión de los circuitos de memoria del hipocampo [11]. Concretamente, se ha visto que entre un 5% y 10% de las neuronas nuevas del giro dentado presentan morfologías aberrantes incluyendo neuronas ectópicas, neuronas con más de una dendrita apical (bipolares) y neuronas con arborización dirigida hacia el hilus en lugar de hacia la CG [12]. Además, parte de las neuronas del lado ipsilesional mostraban una reducción en la arborización y de la longitud de dendrita apical, mientras que las generadas del lado contralesional presentaban un aumento de la arborización y de la longitud de dendrita apical [11].

Por todo lo descrito anteriormente, el estudio de los componentes celulares del nicho neurogénico hipocampal es fundamental para comprender e identificar posibles dianas terapéuticas para tratar el deterioro cognitivo post-ictus. Además, dada la gran heterogeneidad etiológica y lesiva del ictus, resulta necesario estudiar la respuesta neurogénica hipocampal en nuevos modelos experimentales de ictus isquémico.

Hipótesis y objetivos

Para el presente estudio se plantea la hipótesis de que el ictus isquémico inducido por cloruro férrico en ratón promueve el desarrollo de neurogénesis hipocampal maladaptativa, así como de un deterioro cognitivo post-ictus a largo plazo. El objetivo principal del presente estudio es llevar a cabo la caracterización del modelo experimental de isquemia cerebral permanente mediante cloruro férrico y su relación con la neurogénesis hipocampal adulta y el deterioro cognitivo post-ictus. Para ello, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluación de la lesión en fase aguda, así como de la atrofia y perfusión en fase crónica post-ictus.
2. Análisis del número de células proliferativas a diferentes tiempos tras la isquemia en el giro dentado del hipocampo.
3. Análisis del número de neuroblastos a diferentes tiempos tras la isquemia en el giro dentado del hipocampo.
4. Análisis del porcentaje de neuronas aberrantes en el giro dentado del hipocampo de ratones isquémicos.
5. Evaluación de la memoria de reconocimiento y de la ansiedad de ratones en fase crónica post-ictus.

Materiales y métodos

Animales utilizados y grupos experimentales

Todos los experimentos se realizaron en ratones macho de 8 a 11 semanas de la cepa C57BL/6. Los animales fueron mantenidos en el animalario del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC) en ambiente con temperatura controlada, ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y dieta

estándar. Para este estudio, los animales fueron sometidos a un modelo de isquemia cerebral focal permanente (pMCAO de sus siglas en inglés “*permanent middle cerebral artery occlusion*”) inducida por cloruro férrico (FeCl₃). El estudio contó con los siguientes grupos experimentales:

- Grupo experimental 1: animales isquémicos sometidos a cirugía de pMCAO y sacrificados 7 días tras isquemia para la caracterización de la neurogénesis hipocampal (n=4).
- Grupo experimental 2: animales isquémicos sometidos a cirugía de pMCAO y sacrificados 30 días tras isquemia para la caracterización de la neurogénesis hipocampal (n=3).
- Grupo experimental 3: animales isquémicos sometidos a cirugía de pMCAO para tests de comportamiento 5 semanas tras isquemia y para evaluación de atrofia y perfusión 7 semanas tras isquemia (n=18).
- Grupo de controles sham: animales sometidos al proceso de cirugía, sin ocluir la arteria cerebral media de modo que no hay isquemia y sirve como control del procedimiento quirúrgico. Se utilizó un grupo de animales sham para cada grupo experimental (n=3, 3, 10 respectivamente).

Inducción quirúrgica de isquemia cerebral focal

Se llevó a cabo la cirugía de isquemia cerebral focal permanente en los ratones mediante oclusión por generación de un trombo en la arteria cerebral media (MCAO) con cloruro férrico al 20% en NaCl. Estas cirugías fueron realizadas por el personal pre-doctoral del grupo con la capacitación de experimentación animal de la Comunidad de Madrid. Previamente, los ratones fueron anestesiados con sevoflurano (SevoFlo, Zoetis) al 5% en cámara de inducción y al 4% para el mantenimiento, en una mezcla de 80% aire / 20% oxígeno. Se les inyectó buprenorfina (Bupaq, Richter Pharma) por vía subcutánea a una dosis de 0,2mg/kg como analgésico. Posteriormente, se realizó una incisión en la región temporal izquierda para retirar la piel y el músculo, y exponer así el cráneo. Se hizo una craneotomía justo encima de la arteria cerebral media (MCA del inglés “*middle cerebral artery*”), sobre la cual, una vez expuesta, se colocó un papel whatmann de 2 mm² con 5µl de FeCl₃ que se mantuvo durante 10 min para producir el trombo. Posteriormente se retiró el papel y se observó la oclusión de la MCA. Finalmente, se suturó la incisión con hilo de 6/0. Los animales del grupo control Sham se sometieron al mismo procedimiento, pero el papel whatmann se impregnó con 5µl de suero salino.

Cuantificación de porcentaje de hemisferio infartado, de atrofia y de perfusión tras isquemia

Para cuantificar el porcentaje de hemisferio infartado de los animales isquémicos se analizó mediante imagen por resonancia magnética (IRM) de la región cefálica 24h después de la cirugía. A partir de las imágenes de IRM se midió el área del infarto y de ambos hemisferios con el programa Fiji-ImageJ versión 1.53q, utilizando la herramienta de “polygon selections” del programa. Se calculó el porcentaje de hemisferio infartado utilizando la fórmula: % HI = (Vol_{inf} / Vol_{contra}) * 100, donde Vol_{inf} es el volumen de infarto (área ipsilateral infartada / índice edema) y Vol_{contra} es el volumen de hemisferio contralateral. El índice de edema se calculó como: Edema = ((Vol_{ipsi} - Vol_{contra}) / Vol_{contra}) * 100.

Para cuantificar la atrofia y la perfusión cerebral se les realizó una IRM convencional, así como una IRM de perfusión de marcado arterial de spin o ASL (del inglés “*arterial spin labeling*”) a los ratones 5 semanas tras la cirugía. La técnica de ASL utiliza pulsos de radiofrecuencia para marcar los protones de la sangre arterial. De este modo se obtiene, de una manera no invasiva, un mapa cuantitativo del flujo sanguíneo cerebral o CBF (del inglés “*cerebral blood flow*”). A partir de las imágenes de IRM se midió el área de ambos hemisferios, de corteza y de hipocampo; y del mapa cuantitativo del CBF se midió el flujo sanguíneo en dichas áreas previamente delimitadas. Para lo anterior, se utilizó el programa Fiji-ImageJ versión 1.53q.

Sacrificios y extracción de cerebros

Los ratones se sacrificaron a 7 y 30 días después de las cirugías según el grupo experimental correspondiente y sus controles. Se realizó el sacrificio por sobredosis anestésica con sevoflurano hasta confirmar la parada respiratoria. Los animales fueron perfundidos por punción intracardiaca del ventrículo izquierdo con 50mL de PBS 1X y 50mL de paraformaldehído (PFA) al 4%. Los cerebros fueron fijados en PFA al 4% durante 2 horas a T^a ambiente y luego deshidratados en sacarosa al 30% en PBS 1X durante 48 h. Por último, se marcó el hemisferio contralateral de los cerebros realizando una pequeña incisión en la parte ventral, se congelaron en isopentano y se almacenaron a -80°C.

Seccionamiento de tejido cerebral e inmunofluorescencias

Se realizó el seccionamiento de los cerebros congelados de manera rostro-caudal con un microtomo de deslizamiento Leica SM 2010R a un grosor de 30µm. Las secciones se almacenaron en solución anticongelante a -20°C hasta su uso. Se llevó a cabo la inmunofluorescencia de DCX y Ki67 para visualizar los neuroblastos y neuronas inmaduras, así como células proliferativas. Se tomaron 5 secciones de cerebro de cada animal de la región de hipocampo y se procedió a realizar las inmunofluorescencias en flotación.

Para la visualización de DCX, las secciones se permeabilizaron previamente por 1 h con Tritón 1% en PBS 1X. Posteriormente, las secciones se lavaron con PBS 1X tres veces durante 5 min, y se bloquearon con 500 μ L de solución de bloqueo (BSA 5% y Tritón 0,25% en PBS 1X) durante 1 h a T^a ambiente y en agitación. Se incubó durante una noche a 4°C con 300 μ L de solución de los anticuerpos primarios: anticuerpo conejo anti-DCX (1:250, Ab18723, Abcam) y rata anti-Ki67 (1:200, 14-5698, Invitrogen). Al día siguiente, se procedió a lavar los anticuerpos primarios con PBS 1X-Tritón 0,25% y las secciones se incubaron durante 2 h a T^a ambiente y en agitación con 300 μ L de solución de los anticuerpos secundarios: cabra anti-conejo biotilado (1:250, A120-101B, BioNova) y Alexa Fluor 555 cabra anti-rata (1:200, A21434, Invitrogen), seguido por una incubación de 1 h con estreptavidina 633 (1:400, 521375, Invitrogen). Por último, se incubó con DAPI 1:6000 por 5 min y se lavó tres veces con PBS 1X. Las secciones se montaron con Aqua Poly Mount (PolySciences Inc.) en portaobjetos gelatinizados.

Análisis de inmunofluorescencias

La toma de imágenes de la inmunofluorescencia se llevó a cabo con el microscopio confocal Leica gated STED-3X- WLL SP8 de la unidad de microscopía del CNIC, mediante un objetivo 40x con aceite de inmersión. Se tomaron imágenes de 6 giros dentados de cada animal, con capturas en el eje z (z-stack). Se tomó un z-stack de 65-70 secciones con un “z-step size” de 0.33 μ m y con un formato de imagen 1024x1024. Se utilizó el canal rojo (633 nm) para visualizar DCX, el canal amarillo (555 nm) para visualizar Ki67 y el canal UV (405 nm) para visualizar los núcleos teñidos con DAPI. Se llevó a cabo la cuantificación de somas de neuroblastos y neuronas inmaduras utilizando el programa ImarisViewer versión 9.8.2. Los datos se presentan como número de células DCX⁺ / μ m de giro dentado. Adicionalmente, se realizó el análisis del de neuronas DCX aberrantes con el programa ImarisFull X64 versión 9.1.2, utilizando la herramienta de filamentos. Los datos se muestran como número de células DCX⁺ aberrantes / mm de giro dentado, así como porcentaje de DCX⁺ aberrantes respecto a número de células DCX⁺ totales.

Pruebas de comportamiento

Se llevó a cabo la prueba de campo abierto (OF, del inglés “*Open Field*”) con el fin de evaluar la actividad locomotora y la ansiedad de los animales. Para ello, en una caja blanca de 45x45x40 cm se dejó a los ratones explorar libremente durante 7min. Se cuantificó la actividad locomotora y el % de tiempo que los animales pasan en las diferentes regiones (centro, interior y periferia) con el programa ANY-maze. A continuación, se hizo el test de reconocimiento objeto nuevo (NOR, del inglés “*Novel Object Recognition*”) con el fin de evaluar la memoria de reconocimiento de los ratones. En primer lugar, se realizó una fase de entrenamiento de 5 min en la que los ratones exploraron el recinto, el cual contenía 2 objetos iguales. Pasado un ITI (intervalo entre pruebas, del inglés “*Intertrial Interval*”) de 3 h se realizó la segunda fase de la prueba en la que uno de los objetos anteriores fue reemplazado por uno nuevo y se dejó que los ratones exploraran durante 5 min. Se evaluó la capacidad de los animales para diferenciar el objeto nuevo del familiar mediante el programa ANY-maze y se calculó el porcentaje de tiempo de exploración de cada objeto.

Análisis estadístico

Se realizó una prueba Mann Whitney no paramétrica para comparar 2 grupos, pruebas t paramétricas, prueba no paramétrica Wilcoxon y pruebas de ANOVA paramétricas de una vía o de dos vías (según el número de factores correspondiente), seguidas de una prueba Tukey o Bonferroni's. Todos los datos se presentan como media \pm error estándar de la media (EEM). Se asumió un valor p<0.05 como estadísticamente significativo. Los datos fueron analizados y graficados con el programa GraphPad Prism versión 9.4.1.

Resultados

Evaluación de la lesión inicial en fase aguda y de la atrofia e hipoperfusión cerebral en fase crónica en el modelo pMCAO inducido por FeCl₃

En primer lugar, los ratones se sometieron a ictus isquémico por el modelo de pMCAO con cloruro férrico, y 24 h después se cuantificó el volumen de infarto mediante imagen por resonancia magnética (IRM). En la Figura 1A se puede observar una región hiperintensa que corresponde a la zona infartada de la corteza cerebral a lo largo del eje rostro-caudal de la IRM. Al calcular el porcentaje de hemisferio infartado, se determinó que los animales del grupo experimental de 7 días contaron con un volumen de infarto de 12,1 \pm 2,17 %, mientras que los animales del grupo de 30 días presentaron un 27,0 \pm 15,6 % de hemisferio infartado.

Una vez evaluada la lesión inicial del infarto en fase aguda, se quiso determinar si en fase crónica post-ictus hay atrofia de diferentes estructuras cerebrales. Para ello se cuantificó el volumen total del hemisferio, de la corteza y del hipocampo a nivel ipsilateral y contralateral 7 semanas tras isquemia mediante IRM. De

manera visual, en las imágenes se puede apreciar una reducción en el tamaño de la corteza ipsilateral, así como el aumento del tamaño del hipocampo ipsilateral (Figura 1B). Al realizar la cuantificación, se observó que existe un aumento significativo del volumen del hipocampo ipsilateral. En contraposición, se muestra una pérdida de corteza ipsilateral significativa, y por consiguiente una pérdida significativa del tamaño total del hemisferio ipsilateral (Figura 1C).

Adicionalmente, se quiso evaluar si existe una hipoperfusión cerebral en fase crónica post-ictus. Para esto se cuantificó el flujo sanguíneo cerebral (CBF) en el hipocampo y en la corteza de ambos hemisferios mediante RM de perfusión por ASL, como se puede observar en la Figura 1D. Como se puede observar en la Figura 1E, al representar el porcentaje de CBF en las estructuras ipsilaterales respecto al CBF en las estructuras contralaterales, se observó que los ratones isquémicos mostraron un porcentaje de CBF significativamente menor en la corteza ipsilateral, y aunque no mostraron significación en el porcentaje de CBF total de todo el hemisferio ipsilateral, si se observó una tendencia en la disminución del flujo sanguíneo.

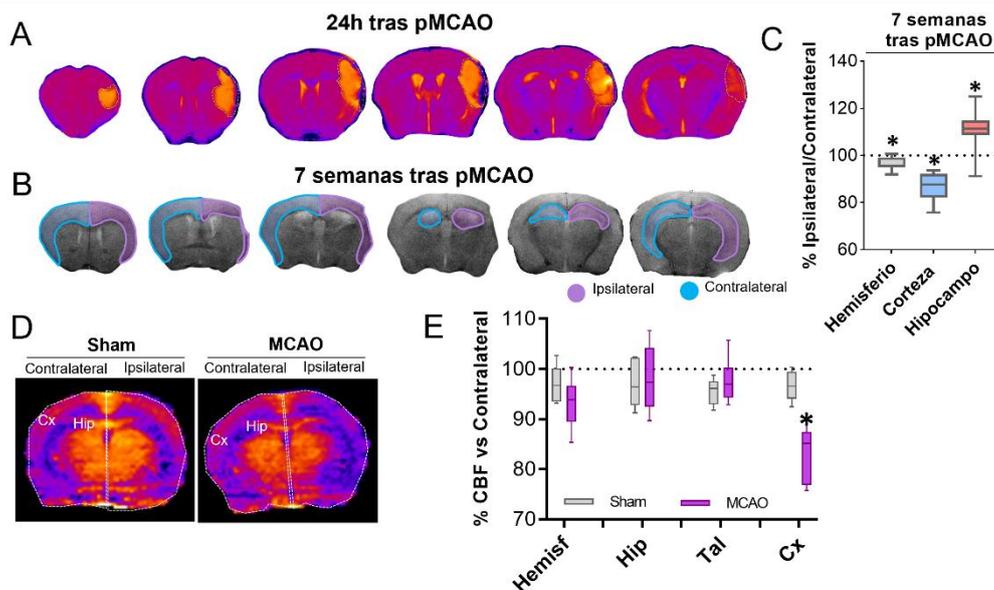


Figura 1.- Evaluación del daño inicial y en fase aguda y la atrofia cerebral y perfusión en fase crónica mediante imagen por resonancia magnética. (A) Imágenes representativas de IRM de un animal isquémico 24 h tras la oclusión de la arteria cerebral media en donde la zona infartada se aprecia como una región hiperintensa. (B) Imágenes representativas de la cuantificación del volumen de corteza de hipocampo 7 semanas tras isquemia (C) Porcentaje de atrofia de la corteza, hipocampo y hemisferio ipsilateral respecto al contralateral. Los datos se muestran como media \pm EEM. Se utilizó un test no paramétrico Wilcoxon y se muestra diferencia significativa para los tres ($n=5-9$; $*p<0,05$). (D) Imagen representativa de la cuantificación de flujo sanguíneo cerebral (CBF) en animales sham e isquémicos (E) Flujo sanguíneo cerebral (CBF) en hemisferio total (Hemisf), hipocampo (Hip), tálamo (Tal) y corteza (Cx) ipsilateral y contralateral 7 semanas tras cirugía. Los datos se muestran como media \pm EEM. Se utilizó un test ANOVA de 2 vías y se muestra diferencia significativa en la cirugía ($F_{(1,48)}= 6,843$, $p=0,0119$) (Bonferroni's post hoc; $n=5-9$; $*p<0,05$).

Evaluación de la neurogénesis hipocampal en modelo pMCAO inducido por FeCl₃

Para determinar si existe un aumento en la neurogénesis hipocampal en el modelo de pMCAO inducido por cloruro férrico, llevamos a cabo una inmunofluorescencia de DCX y Ki67 para marcar los neuroblastos y células proliferativas respectivamente en ratones sham e isquémicos a 7 y 30 días tras la cirugía. Se llevó a cabo la cuantificación de células Ki67⁺, así como de neuroblastos DCX⁺ en los hemisferios ipsilateral y contralateral. En el caso de Ki67, se encontró un aumento en el número de células Ki67⁺ en el hemisferio ipsilateral a los 7 días tras isquemia en comparación a los controles sham (datos no mostrados). Por otro lado, en el caso del análisis de neuroblastos, nuestros datos muestran que existe un aumento significativo en el número de células DCX⁺ por longitud de GD 7 días tras la cirugía en el lado ipsilateral del cerebro (Figura 2C). En el caso del lado contralateral 7 días tras la cirugía, solamente se encontró una tendencia no significativa, así como en ambos hemisferios 30 días tras la cirugía (Figura 2C y 2D). Adicionalmente, se mostró que hay significativamente más DCX⁺ por longitud de GD 7 días tras isquemia en comparación a 30 días tras isquemia.

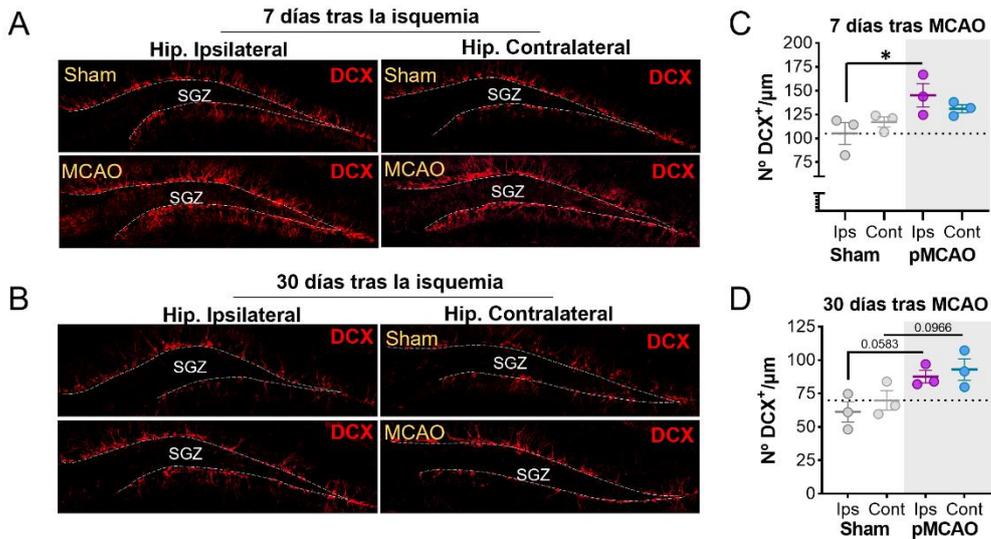


Figura 2.- Cuantificación de número total de neuroblastos y neuronas inmaduras DCX⁺ en ZSG 7 y 30 días tras isquemia. (A-B) Imágenes representativas de células DCX⁺ (rojo) en lados ipsilateral y contralateral a 7d (A) y 30 d (B) en ratones sham y pMCAO. (C-D) Cuantificación de células DCX⁺ por longitud de GD de ratones sham y pMCAO a 7d y 30d tras isquemia. Los datos se presentan como media ± EEM. Se usó ANOVA de 2 vías y se muestra diferencia significativa para la cirugía a 7d tras isquemia ($F_{(1,8)}=12,46$; $p=0.0077$). (Bonferroni's post hoc: * $p<0,05$ $n=3-3-4-4$).

Evaluación de la morfología aberrante de las nuevas neuronas generadas en el hipocampo en el modelo de pMCAO inducido por FeCl₃

Con el fin de determinar si existen alteraciones morfológicas de la neurogénesis en la ZSG tras la inducción de pMCAO, se llevó a cabo una cuantificación de neuronas inmaduras DCX⁺ con morfología aberrante en el GD. Las neuronas aberrantes fueron cuantificadas tanto en el hemisferio ipsilateral como en el contralateral de los ratones isquémicos y de sus controles sham (Figura 3B). Se consideraron morfologías aberrantes aquellas que se describen en la Figura 3A. Se representa la densidad de células DCX aberrantes como número de DCX aberrantes/mm de giro dentado, así como el porcentaje de células DCX aberrantes respecto al número total de células DCX⁺ en el GD. Se observó que, normalizando respecto a la longitud del giro dentado, hay un aumento significativo en la densidad de neuronas aberrantes que ocurre de manera bilateral 30 días tras la isquemia. Adicionalmente, se observó que este aumento en la densidad de neuronas aberrantes es significativamente mayor en el hemisferio ipsilateral en comparación al hemisferio contralateral de los ratones isquémicos (Figura 3C). En cuanto al porcentaje de DCX⁺ aberrantes (normalizando respecto a número total de células DCX⁺), se determinó que hay un aumento significativo en el porcentaje neuronas aberrantes solamente en el hemisferio ipsilateral 30 días tras isquemia. Asimismo, se puede observar un porcentaje significativamente mayor de neuronas aberrantes en el hemisferio ipsilateral en comparación al contralateral de ratones isquémicos (Figura 3D).

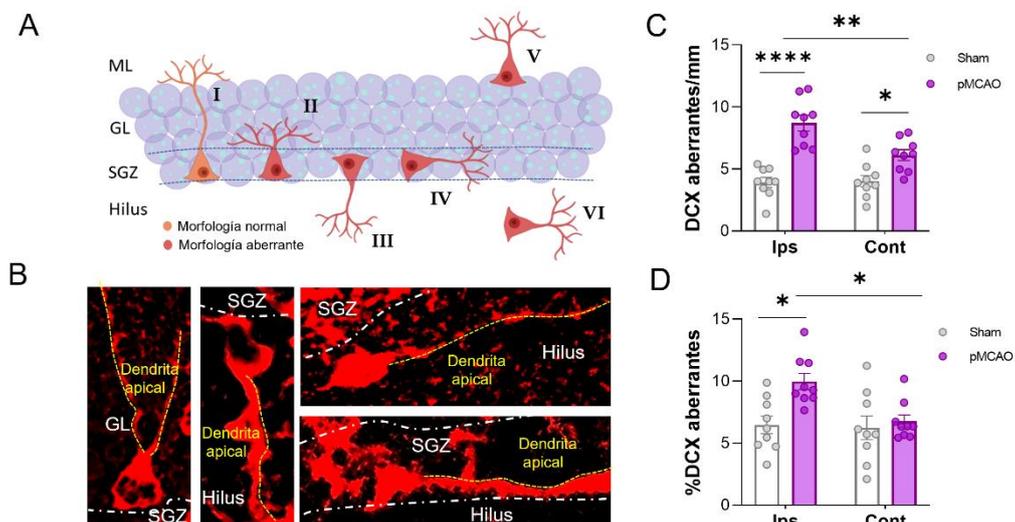


Figura 3.- Cuantificación de neuroblastos aberrantes 30 d tras isquemia. (A) Esquema representativo del GD con tipos de neuroblastos aberrantes; I) morfología normal; II) neuroblasto bipolar, sin dendrita apical y con dos o más

prolongaciones desde el soma; III) neuroblasto con crecimiento inverso dirigido hacia hilus; IV) neuroblasto con crecimiento horizontal en ZSG; V) neuroblasto ectópico en CM; VI) neuroblasto ectópico en hilus. (B) Imágenes representativas de neuroblastos DCX⁺ aberrantes de hemisferio ipsilateral 30d tras isquemia. De izquierda a derecha: bipolar, crecimiento inverso, ectópico en hilus y crecimiento horizontal. (C) Cuantificación de número de neuroblastos DCX⁺ aberrantes en ambos hemisferios de ratones isquémicos (pMCAO) y controles (Sham) por mm de GD. Los datos se muestran como media ± EEM. Se utilizó un test ANOVA de 2 vías y se muestra interacción significativa en el hemisferio cerebral ($F_{(1,32)}=6.431$, $p=0.0163$) y en la cirugía ($F_{(1,32)}=49.34$, $p<0.0001$). (D) % de neuroblastos DCX⁺ aberrantes respecto al número total de neuroblastos DCX⁺ en el GD. Los datos se muestran como media ± EEM. Se utilizó un test ANOVA de 2 vías y se encontró una interacción significativa en el hemisferio cerebral ($F_{(1,32)}=5.602$, $p=0.0242$) y en la cirugía ($F_{(1,32)}=7.565$, $p=0.0097$) (Tukey post hoc, $n=9-9-9-9$; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.0001$).

Evaluación del deterioro cognitivo y la ansiedad post-ictus en modelo de pMCAO con FeCl₃

Para evaluar si el modelo de pMCAO por cloruro férrico produce a largo plazo un deterioro cognitivo post-ictus, se llevaron a cabo las pruebas de comportamiento de campo abierto (OF) y de reconocimiento de objeto nuevo (NOR) en animales 5 semanas tras isquemia. Con relación al OF, se determinó que los ratones isquémicos (pMCAO) contaron con una distancia total recorrida significativamente menor y con un tiempo inmóvil en el campo significativamente mayor, respecto a los controles sham (Figura 4B y 4C). Adicionalmente, se muestra que los animales isquémicos pasaron significativamente menos tiempo en el centro del campo, tanto recorriendo menos distancia, como realizando menos visitas al centro en comparación a los controles sham. En contraposición, no hubo diferencias significativas en el tiempo que los animales ocuparon en las zonas de interior y periferia (Figura 4E, 4F y 4G).

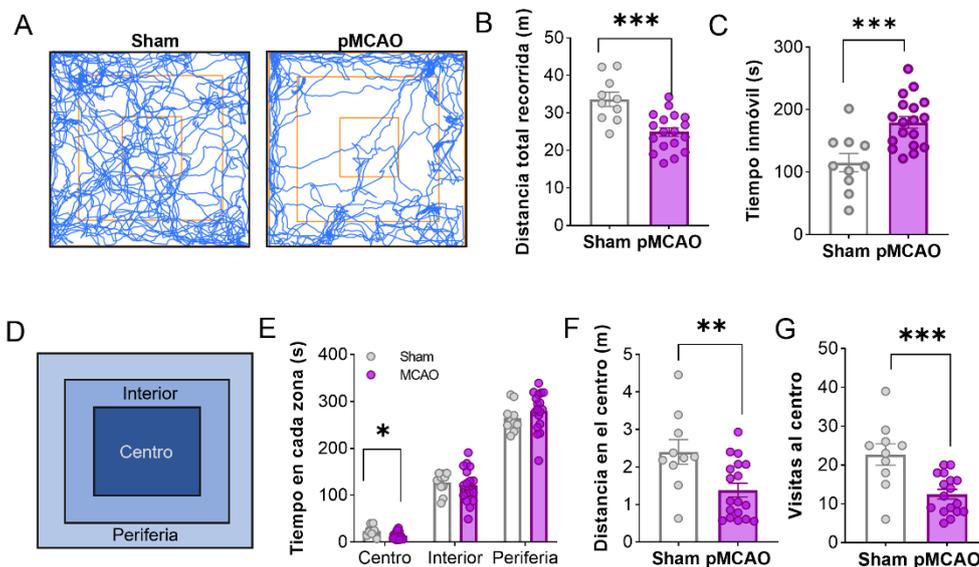


Figura 4.- Evaluación de ansiedad por la prueba OF en animales 5 semanas tras la isquemia. (A) Imagen representativa del recorrido seguido por los ratones sham y pMCAO. (B) Distancia total recorrida y (C) tiempo inmóvil. (D) Representación esquemática de la prueba OF. (E) Tiempo que los animales pasaron en cada zona del campo. (F) Distancia recorrida en el centro. (G) Visitas al centro. Los datos se muestran como la media ± EEM y se realizaron pruebas t paramétricas ($n=10-18$; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).

Finalmente decidimos evaluar la memoria de reconocimiento mediante la prueba NOR (Figura 5). En este caso nuestros resultados muestran que tanto el grupo sham como el grupo de animales isquémicos presentan una preferencia significativa por el objeto nuevo en comparación con el objeto antiguo (Figura 5B). Sin embargo, al estimar el índice de discriminación (ID) para ambos grupos, tal y como se muestra en la Figura 5C, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, los resultados indican que, mientras que todos los animales sham discriminan ($ID > 0,1$), parte de los animales isquémicos no muestran preferencia por el nuevo objeto ($ID < 0$), sugiriendo que un porcentaje de los animales isquémicos en el modelo de cloruro férrico desarrollan un deterioro cognitivo.

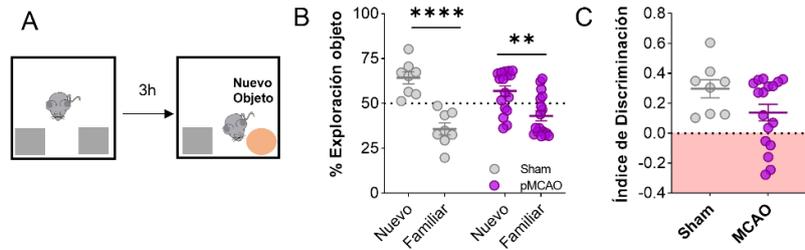


Figura 5.- Evaluación del déficit de memoria de reconocimiento a corto plazo mediante test NOR en ratones 5 semanas tras isquemia. (A) Imagen esquemática del NOR. (B) % de tiempo de exploración del objeto nuevo y familiar en ratones pMCAO y sham. Los datos se muestran como media \pm EEM. Se utilizó un ANOVA de dos vías y se muestra diferencia significativa en el tiempo de exploración ($F_{(1,23)}=20,55$, $p=0,0001$) (Bonferroni's post hoc, $n=10-18$; * $p<0,05$, ** $p<0,01$). (C) Se muestra el índice de discriminación o ID (de -1 a 1) que representa la discriminación que hacen los animales entre el objeto nuevo y el familiar. Los datos se muestran como la media \pm EEM. Se realizó la prueba Mann Whitney ($p=0,1244$, $n=10-18$).

Discusión de resultados

El ictus isquémico es una de las principales causas de muerte e incapacidad en el mundo. Hasta ahora, la mayoría de los estudios se han enfocado en el deterioro de las funciones motoras que sufren los pacientes. A pesar de esto, se ha visto que el ictus también tiene un efecto de deterioro cognitivo de la memoria, del lenguaje y la orientación. Como se mencionó anteriormente, dada la alta heterogeneidad del ictus es necesario estudiar los mecanismos fisiopatológicos en diferentes modelos animales experimentales de la enfermedad, con el fin de identificar posibles dianas terapéuticas para tratar el daño cognitivo post-ictus.

En primer lugar, nuestros resultados muestran que el modelo experimental de pMCAO por cloruro férrico presenta una lesión inicial del infarto que se localiza en la región cortical del hemisferio, de igual manera que se observa en otros modelos de ictus isquémico que afectan a la parte distal de la arteria cerebral media [13]. Como consecuencia de la lesión localizada en la corteza, observamos que el modelo usado resulta en una atrofia cortical ipsilateral a largo plazo con una pérdida de corteza de aproximadamente el 15%. Además, los resultados sugieren que, aunque este modelo de pMCAO no afecta directamente al hipocampo, sí produce una hipertrofia de este, como sucede con otras estructuras cerebrales como el estriado, que podría darse como compensación a la pérdida de corteza observada. Además, a largo plazo se observó que la corteza ipsilateral presenta una hipoperfusión significativa, la cual podría deberse a que era esta la región infartada del cerebro. En cambio, no se observaron cambios significativos en el flujo sanguíneo del hipocampo. Nuestros resultados parecen indicar que no hay alteraciones en el nivel de perfusión de estructuras distintas de la región cortical isquémica.

Como se ha comentado previamente, tras un ictus isquémico se produce un aumento en la proliferación de células precursoras en los dos nichos neurogénicos del cerebro adulto [7, 8, 11]. De hecho, en estudios previos de nuestro grupo, se ha demostrado un aumento en la proliferación en la ZSG con el modelo experimental de pMCAO por ligadura de la arteria cerebral media y de la carótida [11]. Con el fin de determinar si en el modelo por FeCl_3 existe un aumento en la neurogénesis hipocampal tras la isquemia, se analizaron las células proliferativas Ki67^+ , y los neuroblastos y neuronas inmaduras DCX^+ . Coincidentemente, nuestros resultados mostraron que el modelo experimental de pMCAO por cloruro férrico también produce un incremento en la proliferación de células precursoras (marcadas por Ki67) en la ZSG. Determinamos que los ratones isquémicos presentan un incremento significativo en la proliferación en el hemisferio ipsilateral a los 7 días tras isquemia en comparación a los controles sham (datos no mostrados). Cabe resaltar que los ratones utilizados para el presente estudio tenían un genotipo heterocigoto Nestin-GFP para la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor del gen Nes. Se utilizó esta cepa con el fin de visualizar células madre neurales y progenitoras del cerebro, por lo que en el futuro sería interesante realizar inmunofluorescencias de diferentes marcadores característicos del nicho neurogénico para caracterizar el inicio de la neurogénesis hipocampal. Además, previo a el sacrificio de los ratones se les administró 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), por lo que se podrían cuantificar las células del nicho en división con el marcador de BrdU como otra alternativa.

En cuanto al número de neuroblastos y neuronas inmaduras DCX^+ , nuestros resultados muestran que, 7 días tras la cirugía, hay significativamente mayor número de DCX^+ en el hemisferio ipsilateral de ratones isquémicos en comparación a los sham. En publicaciones anteriores de nuestro grupo se demuestran que, en el modelo de pMCAO por ligadura, el número de células DCX^+ en el GD aumenta casi dos veces a los 14 días, alcanzando su punto máximo, y este aumento persiste al menos 35 días tras la isquemia [11]. Nuestros resultados muestran que en el modelo de pMCAO por FeCl_3 hay un aumento significativo de células DCX^+ a los 7 días tras isquemia. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas a 30 días tras isquemia. Para estudiar en qué momento tras la isquemia se encuentra el punto máximo en este modelo, sería conveniente añadir un grupo experimental en un momento temporal previo a los 7 días, por ejemplo

72 h, con el fin de observar el pico de neurogénesis hipocampal. Además, sería importante aumentar el tamaño muestral. Por otro lado, hemos observado que, tanto los ratones isquémicos como los sham mostraron un aumento de células DCX⁺ en el GD a los 7 días tras la cirugía en comparación a 30 días (figura no mostrada). Es importante mencionar que en diversos estudios se ha demostrado que en ratones adultos, la neurogénesis comienza a disminuir significativamente a partir de los 2 meses de edad [13–15]. Por lo tanto, sería necesario incluir animales Naive con el fin de confirmar si este aumento de neuroblastos en los animales sham es consecuencia de la edad de los animales o de la craneotomía de la cirugía.

Como se mencionó anteriormente, en el presente estudio demostramos que, en el modelo de pMCAO por FeCl₃, se afectó la región cortical del cerebro, pero no el hipocampo. Por ello, quisimos comprobar si las nuevas neuronas que se generan en la ZSG mostraban morfologías aberrantes que pudieran contribuir al déficit cognitivo hipocampal característico del ictus isquémico. Nuestros resultados muestran que hay significativamente una mayor densidad de neuronas aberrantes de manera bilateral a los 30 días tras isquemia. Además, cabe señalar que observamos que hay significativamente más neuronas aberrantes en el hemisferio ipsilateral que en el contralateral de los ratones isquémicos. Esto coincide con estudios previos que han descrito morfologías aberrantes de las nuevas neuronas de la ZSG tras isquemia [9, 10, 11]. Concretamente, en una publicación reciente de nuestro grupo en el modelo de pMCAO por ligadura, se demostró que las nuevas neuronas que se generan en la ZSG del lado ipsilateral presentaba una reducción significativa de la longitud de dendrita apical, mientras que las del lado contralateral mostraban dendritas apicales más largas [11]. Sin embargo, en el presente estudio, datos preliminares (no mostrados) parecieran indicar que en el modelo de pMCAO por FeCl₃, no existe diferencias significativas en la longitud de dendrita apical entre los hemisferios ipsilateral y contralateral. Esto se pudo deber a problemas metodológicos derivados del ruido de fondo de las inmunofluorescencias en el canal de 633nm de DCX que no permite visualizar fácilmente las dendritas, ni cuantificar las neuronas con dendrita apical más corta. En cualquier caso, actualmente hemos realizado experimentos de cirugía de pMCAO en un modelo de ratón con genotipo heterocigoto POMC-GFP, para la expresión de GFP en neuronas inmaduras que expresan POMC, en los que observamos que el marcaje de GFP resulta más limpio, lo que permitirá en el futuro cuantificar la longitud de dendrita apical y de la arborización de las nuevas neuronas de la ZSG.

Finalmente, hemos realizado una caracterización comportamental a largo plazo en el modelo de isquemia inducido por cloruro férrico mediante la utilización del OF y del NOR. En el caso del OF, nuestros resultados sugieren un incremento en la ansiedad de los ratones isquémicos a largo plazo al observarse una reducción del tiempo que los animales isquémicos pasan en el centro de la prueba. Además, en el caso del NOR, pese a no encontrar diferencias significativas en el índice de discriminación, se puede observar que existe un porcentaje de los ratones isquémicos (47%) que no son capaces de discriminar el objeto nuevo del objeto familiar. Estos resultados son indicativos de que, tras el modelo de isquemia cerebral inducido por cloruro férrico parte de los animales desarrollan un déficit cognitivo a largo plazo, además de un aumento de la ansiedad.

En conjunto, los resultados preliminares presentados en este estudio apoyan la idea que el modelo de ictus isquémico inducido por cloruro férrico es un modelo experimental adecuado para el estudio de la neurogénesis hipocampal adulta y el deterioro cognitivo post-ictus.

Conclusiones

1. El modelo experimental de pMCAO por cloruro férrico en ratón produce una isquemia cerebral permanente que afecta en fase aguda de manera local exclusivamente a la región cortical.
2. El modelo experimental de pMCAO por cloruro férrico en ratón se asocia a una atrofia cerebral en fase crónica en determinadas regiones cerebrales del hemisferio ipsilateral.
3. El modelo experimental de pMCAO por cloruro férrico en ratón se asocia a una hipoperfusión cerebral en fase crónica localizada principalmente en la zona cortical.
4. El modelo experimental de pMCAO por cloruro férrico en ratón produce un incremento significativo en el número de neuroblastos y neuronas inmaduras DCX⁺ 7 días tras la isquemia en el hemisferio ipsilateral.
5. El modelo experimental de pMCAO por cloruro férrico en ratón produce un incremento significativo en las neuronas inmaduras aberrantes de manera bilateral 30 días tras la isquemia.
6. Los animales isquémicos presentan mayor ansiedad dada por una reducción en el tiempo que pasan en el centro de la prueba de OF.
7. El 47% de los animales isquémicos no son capaces de discriminar el objeto nuevo del objeto familiar.

Por todo lo expuesto anteriormente, considero fundamental la continuación de esta línea de investigación para la futura identificación de dianas terapéuticas en la neurogénesis hipocampal adulta para aminorar el deterioro cognitivo y la demencia en los pacientes de ictus.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer al programa de becas de la Fundación Carolina por darme la oportunidad de hacer el Máster en Dianas Terapéuticas en la Universidad de Alcalá y las prácticas en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). También quiero agradecer a la Dra. María Ángeles Moro por darme un espacio en su grupo de Fisiopatología Neurovascular, al cual dirige, en el CNIC y por confiar en mí para hacer allí mis prácticas y TFM. A mis tutoras, la Dra. Alicia García Culebras y la Dra. María Isabel Cuartero, por enseñarme, ayudarme y guiarme en el tiempo que he estado en el grupo. Gracias por los consejos para mejorar los experimentos, solucionar problemas, y para mi futuro profesional. A todos mis compañeros y amigos del grupo por incluirme desde el inicio, por ayudarme en el laboratorio y por los momentos alegres. Especialmente, gracias a Fco. Javier de Castro quien me guió, apoyó y enseñó a lo largo de los últimos meses. Gracias por ayudarme, explicarme pacientemente todo y por resolverme mis dudas. A mis amigos y compañeros del máster, quienes hicieron de mi experiencia este año en España una aventura. Finalmente, gracias a mi familia y amigos por siempre apoyarme en todas mis decisiones de vida y por estar en todos los momentos importantes, incluso a la distancia.

Referencias

1. Coupland, A. P., A. Thapar, M. I. Qureshi, H. Jenkins, and A. H. Davies. 2017. The definition of stroke. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 110(1): 9-12.
2. World Stroke Organization (WSO). 2021. Annual Report 2021. En: <https://www.world-stroke.org/news-and-blog/news/wso-annual-report-for-2021>
3. Zhang, R., M. Chopp, and Z. G. Zhang. 2013. Oligodendrogenesis after cerebral ischemia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 7(201).
4. Campbell B. C. V., D. De Silva, M. Macleod, S. Coutts, L. Schwamm, S. Davis and G. Donnan. 2019. Ischaemic stroke. *Nature Reviews Disease Primers* 5(1): 70.
5. Barbay, M., M. Diouf, M. Roussel, and O. Godefroy. 2019. Systematic review and meta-analysis of prevalence in post-stroke neurocognitive disorders in hospital-based studies. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 46(5): 322-334.
6. Pendlebury, S. T. and P. M. Rothwell. 2019. Incidence and prevalence of dementia associated with transient ischaemic attack and stroke: analysis of the population-based Oxford Vascular Study. *The Lancet Neurology*, 18(3): 248-258.
7. Rahman, A.A., N. Amruta, E. Pinteaux, and G. J. Bix. 2021. Neurogenesis After Stroke: A Therapeutic Perspective. *Translational Stroke Research*. 12(1): 1-14.
8. Cuartero, M. I. A. García-Culebras, C. Torres-López, V. Medina, E. Fraga, S. Vázquez-Reyes, T. Jareño-Flores, J. M. García-Segura, I. Lizasoain, and M. Á. Moro. 2021. Post-stroke Neurogenesis: Friend or Foe?. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9.
9. Dibajnia, P. and C. M. Morshead. 2013. Role of neural precursor cells in promoting repair following stroke. *Acta pharmacologica Sinica*. 34(1): 78-90.
10. Niv, F., S. Keiner, Krishna-K, O. W. Witte, D. C. Lie, and C. Redecker. 2012. Aberrant neurogenesis after stroke: A retroviral cell labeling study. *Stroke*, 43(9): 2468-2475.
11. Cuartero, M. I., J. de la Parra, A. Pérez-Ruiz, I. Bravo-Ferrer, V. Durán-Laforet, A. García-Culebras, J. M. García-Segura, J. Dhaliwal, P.W. Frankland, I. Lizasoain y M. Á. Moro. Abolition of aberrant neurogenesis ameliorates cognitive impairment after stroke in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 129(4): 1536-1550.
12. Witke, F., M. Ceanga, M. Rudolph, F. Niv, OW. Witte, C. Redecker. A, Kunze, C. Keiner S. 2017. Adult hippocampal neurogenesis poststroke: More new granule cells but aberrant morphology and impaired spatial memory. *PLoS One*. 12 (9).
13. Li, Y. and J. Zhang. 2021. Animal models of stroke. *Animal Models and Experimental Medicine*. 4(3): 204-219.
14. Drapeau, E. and D. N. Abrous. 2008. Stem Cell Review Series: Role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging Cell*. 7(4):569-589.
15. Bondolfi, L., F. Ermini, J. Long, D. Ingram, and M. Jucker. 2004. Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of C57BL/6 mice. *Neurobiology of aging*. 25(3):333-340.
16. Kronenberg, G., A. Bick-Sander, E. Bunk, C. Wolf, D. Ehninger, and G. Kempermann. 2006. Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiology of aging*. 27(10): 1505-1513.