

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Ciencias Biomédicas



“Estudio del uso de ácido lipoico y células derivadas de la médula ósea como estrategia de reparación tisular tras lesión cerebral”

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Sara Paradells Navarro

Dirigida por: Dr. D. José Miguel Soria López

Dra. Dña. M^a Ángeles García Esparza

Dra. Dña. María Miranda Sanz

**VALENCIA
2015**



DR. D. JOSE MIGUEL SORIA LÓPEZ, PROFESOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD CEU CARDENAL HERRERA, DRA. DÑA M^a ÁNGELES GARCÍA ESPARZA, PROFESORA DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD CEU CARDENAL HERRERA, DRA. DÑA MARÍA MIRANDA SANZ, PROFESORA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD CEU CARDENAL HERRERA

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “ESTUDIO DEL USO DE ÁCIDO LIPOICO Y CÉLULAS DERIVADAS DE LA MÉDULA ÓSEA COMO ESTRATEGIA DE REPARACIÓN TISULAR TRAS LESIÓN CEREBRAL” de la que es autora Dña. Sara Paradells Navarro, ha sido realizada bajo nuestra dirección, y reúne las condiciones científicas y formales para ser defendida ante el tribunal correspondiente, a fin de obtener el Grado de Doctora.

Y, para que conste a efectos oportunos, firmamos la presente en Moncada a 9 de Junio de 2015.

Fdo. José Miguel Soria López

Fdo. M^a Ángeles García Esparza

Fdo. María Miranda Sanz

Memoria presentada por Sara Paradells Navarro para optar al grado de Doctora.

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Ramón Areces, Programa de ayudas a la investigación Banco Santander-Universidad Cardenal Herrera-CEU.

AGRADECIMIENTOS

He podido comprobar durante estos cinco años que realizar una tesis doctoral no es nada fácil, pero sobre todo que aunque quizá es a la doctoranda, en este caso una servidora, a quien este trabajo le supone más horas enclaustrada en un laboratorio y muchos quebraderos de cabeza diarios, conseguir llegar al final es gracias a la ayuda de todo un equipo.

Pues en este caso, aunque podríamos decir que he formado parte de un grupo de investigación no demasiado grande, he sentido en todo momento que formaba parte de un gran equipo formado por muchas personas que me han ayudado de una forma u otra durante el recorrido, empezando por todos aquellos que han hecho el mismo camino anteriormente y que han estado dispuestos a ayudarme en cualquier momento, a compartir sus errores para facilitarme el camino y evitar que volviese a caer en los mismos, aquellos que me han facilitado un artículo en un momento dado o aquellos que simplemente y para nada menos importante me han dado su apoyo constante. Por eso quiero dar las gracias a todos ellos.

En primer lugar quiero agradecer a María Muriach que me hiciese pensar en la posibilidad de echar mi CV en el CEU con el objetivo de que me pudiesen conocer y en el caso de ser elegida, poder realizar allí una tesis doctoral. He de decir que esto jamás había estado en mis planes, puesto que a mí me gustaba la docencia y mis pensamientos estaban puestos en ello, por lo que llevar a cabo el paso de empezar a trabajar en una tesis me provocó una migraña de más de tres días. Nunca olvidaré esos días de verano intentando descubrir que sería lo acertado para mí. Sin embargo, escuchando su testimonio me parecía que aquello a lo que tenía que estar dispuesta era a trabajar con ratones muchísimas horas, leer artículos y aprender muchísimas cosas. Recuerdo que me dijiste que nunca se dejaba de aprender. Así que pensar en todos los conocimientos que me podía aportar junto con una experiencia docente, me llevó a cambiar mis planes. María, te estaré eternamente agradecida porque gracias a este pensamiento que tú introdujiste en mi cabeza he vivido una experiencia personal y profesional inolvidable. Gracias también por poder contar siempre con tu ayuda y tus sabios consejos. GRACIAS.

Pero este pensamiento se hubiese quedado en nada si mi director de tesis, José Miguel Soria, no me hubiese dado la oportunidad de poder empezar a formar parte de su equipo de investigación. Te agradezco José Miguel la confianza depositada en mí en ése momento. Pero además te doy las gracias por la paciencia durante estos años, por tu apoyo en los momentos en los que las cosas parecía que no salían bien. Gracias por saber cuándo darme un respiro antes de llegar al límite, por saber lidiar con los problemas, por hacerme siempre partícipe de las actividades del laboratorio pudiendo con ello formar parte de muchas de las publicaciones que se han realizado dirigidas por ti. GRACIAS.

Quiero agradecer a mi también directora de tesis, M^a Ángeles García su disponibilidad y su ayuda siempre que lo he necesitado, por permitirme colaborar con el trabajo de la ocratoxina, porque cada experimento nuevo es un reto y un aprendizaje. GRACIAS.

Pero no he tenido dos, sino tres directores de tesis, pues he podido contar también con la ayuda de María Miranda, tan excepcional como profesional y como persona. Es un placer y una suerte poder encontrar personas así en este camino de la investigación. Gracias María por tus clases sobre HPLC y por tu ayuda siempre y en cualquier momento del día, por hacer fáciles las cosas difíciles, por encontrar siempre un camino alternativo a los problemas. Por ponerle pasión a la investigación. GRACIAS.

Pero como decía al principio el camino no es nada fácil y te puedes encontrar en el recorrido con muchos baches, unos más profundos que otros, que debes aprender a atravesar. Yo soy la primera que me he quejado todo lo que he podido de ellos, pero en realidad, que sería de la vida sin esas pequeñas cruces que nos enseñan a dar menos importancia a las cosas que no la tienen y aprender que hay muchos tipos de personas y no todas son como a

nosotros nos gustaría, pero todas ellas con sus pequeñas o grandes virtudes. Además, gracias a Dios he seguido contando con numerosas personas que me han tendido su mano para poderlos cruzar.

Gracias Brenda por hacer camino antes que yo, porque gracias a los avances que ya habías logrado antes de mi llegada, trazar mi camino fue más fácil, por poderte ayudar y aprender con ello. GRACIAS.

Gracias también a esas primeras manos que me encontré en el sótano, a Teresa Esteban, por sus conversaciones en mis primeros tímidos y perdidos días, por dejarme acompañarte al zulito del microscopio de fluorescencia donde me diste mis primeras lecciones del microscopio acompañadas de música y conversación. Por ayudarme siempre que estaba en tus manos, por tus bromas diarias que me ayudaban a llevar con alegría el día a día. También pude contar, entre esas manos, con aquellas entonces doctorandas veteranas que se manejaban como pez en el agua en los laboratorios. Gracias a Inma Almansa por ser un ejemplo de trabajo y constancia. Por estar siempre dispuesta a ayudar y dar su punto de vista, siempre con amabilidad y una sonrisa. Gracias también por hacerme partícipe de las primeras fiestas de tesis doctorales, porque así tuve la oportunidad de conocer mejor a aquellos doctorandos que formaban parte de otras áreas como la de bioquímica. Gracias también a Rosa López, por su ayuda siempre en mis dudas caóticas sobre los anticuerpos de western blot entre otras, por su apoyo y preocupación en el día a día, por su experiencia y enseñanzas. Así mismo, en aquella época pude conocer a otras doctorandas veteranas como Raquel, porque se necesitan pocos minutos para percatarse de su humanidad, gracias Raquel porque encontrarse con una persona que transmite tal paz y tranquilidad es de agradecer, puesto que en un laboratorio hay momentos donde todos vamos más que acelerados. GRACIAS.

Pero sobre todo entre esas primeras manos estaban Violeta y Miguel, su apoyo, su ayuda, sus conversaciones y su escucha, sus bromas y sonrisas continuas fueron parte de la fuerza que evitó que desistiera de esta aventura en más de una ocasión en un primer y duro año de tesis. GRACIAS.

Fue también en este año cuando tuve la oportunidad de conocer a Isi, compañero de fatigas que me enseñó con paciencia todos los trucos para manejar de la mejor forma posible las tan preciadas micropipetas y muchísimas cosas más, cuando él era ya un excelente técnico de laboratorio y yo lo poco que conocía de un laboratorio era lo aprendido en las prácticas desarrolladas en la carrera. Gracias por tu ayuda en esas horas de pinchazos de ratas, fuese Sábado o Domingo, por darme tranquilidad cuando tener que trabajar con ellas aún me daba bastante respeto. Por tu apoyo, ayuda y conversaciones. Por ser una gran persona. GRACIAS.

Pero además en mi segundo año de tesis tuve la oportunidad de realizar una estancia en el CABIMER de Sevilla. No podría haber imaginado encontrarme unos compañeros de trabajo más maravillosos, y ello fue gracias a la oportunidad que me brindó Manuel Álvarez Dolado. Gracias Maleles por enseñarme y ayudarme junto con Ivan Zipancic con los trasplantes de células, aunque ello supusiera madrugar muchísimo y comer a la hora de la merienda, trabajando siempre con precisión, compañerismo y alegría, porque... ¡eso sí que es ciencia!. Gracias Maleles por enseñarme los trucos del vibratomo, por preocuparte de mi estancia, por acercarme a casa miles de veces, por ser una persona maravillosa. Gracias Iván, porque desde que te conocí en el viaje a Sevilla me has enseñado muchas cosas, como trabajar con precisión, perfundir perfectamente dos ratones a la par, el funcionamiento del Endnote, algún que otro truco del Photoshop, así como escribir artículos y montar figuras de la mejor forma posible, entre otros. Por tu paciencia y ayuda, por tu bondad. Gracias también a Mercedes y Marina Inés, por su ayuda en cada cosita que necesitaba, dentro y fuera del labo, por sus enseñanzas, por las conversaciones durante las soleadas comidas. GRACIAS.

El recorrido continuó de nuevo en Valencia, con la compañía y ayuda de gente maravillosa. Gracias María García por los protocolos compartidos, por las carcajadas que conseguías producirme, por los maravillosos estilismos que alegraban el día. Gracias Juanjo por las conversaciones tan divertidas en ese labo de cultivos, por las mil y una listas de reproducción que no dejaban de sonar. Gracias a las chicas de AP, Mariola y Ana, por su compañía continua en el sótano, por su alegría a pesar de las infinitas horas trabajadas. Gracias a María Maroto "per eixes xarradetes valencianes, per eixe humor i risotades que només els de parla valenciana entenem". Gracias a Laura Franch, por estar siempre dispuesta a ayudar, por sus explicaciones incluso gráficas de las rutas bioquímicas, por llevarnos a sitios buenísimos del Carmen donde disfrutar de una buena cena. Gracias María Sebastián por tu comprensión y por aclararme todas las dudas de los papeleos para las estancias, por tus miles de anécdotas que no dejan el labo jamás en silencio. Gracias Cris Macías por tu apoyo incondicional, por preocuparte siempre por mí, por prestarme mil y una cosas en el último momento, por las conversaciones profundas. Gracias Jaime por ser tan manitas, siendo capaz de solucionar muchos problemas, por los tantísimos artículos que me has proporcionado, por ser tan trabajador, optimista y eficaz. Gracias también a Rik, por facilitarme las cosas con tu rápido aprendizaje, por saber escuchar. Gracias Elisabetta por tu simpatía y amistad, ha sido un placer conocerte. Pero sobre todo gracias a todos por vuestra comprensión y ayuda siempre, porque sin vosotros la investigación no podría seguir adelante. Porque sois geniales, GRACIAS.

Gracias a las chicas de la FOM por darme vía libre para usar el microscopio, por las horas de confocal. Gracias al equipo de Verdugo, por su ayuda en el microscopio electrónico y sus consejos de laboratorio. GRACIAS.

Gracias a Cris Llinares, por darme la oportunidad de trabajar con compañerismo dentro de mi mismo grupo de investigación, codo con codo. Por ser genial, eficiente, detallista e imaginativa. Por ayudarme con miles de cosas, desde hacer unas fotos en el microscopio hasta buscar información sobre anticuerpos. Por ser la mejor compi de bancada. GRACIAS.

Gracias también a todos aquellos que me he encontrado en el recorrido y que me han ayudado de una forma u otra (Bego, Marta Hernández, Enric, David, Nacho, Laura Ramón, M^oCarmen). Y a todos aquellos doctorandos que han empezado su tesis cuando yo ya la estaba terminando, gracias por ser esas nuevas y frescas ganas de trabajar por la investigación. Gracias a Laura Trachsel por su simpatía y capacidad de trabajo, pero también a Esther, Tanya, Inma, Susi y Pili, por su apoyo. GRACIAS.

Gracias también a todo el personal de servicios, reprografía, secretaría, limpieza... En especial a Lorena, por preocuparse por nosotros. GRACIAS

Gracias también a José Antonio por resolver cualquier problema del laboratorio a pesar de ir cargado de trabajo, por sus consejos y su apoyo, porque eres una gran persona. Pero también quiero agradecer a Ana y Vanesa su disponibilidad y ayuda en cualquier momento. GRACIAS.

También he podido realizar una inolvidable estancia en el Hospital San Raffaele de Milán, gracias a la oportunidad que me dio Vania Broccoli de trabajar en su laboratorio de gran nivel. Gracias a todo su equipo, Luca, Alicia, Cinzia, Simona, Alessandro, Serena, Gaia, Giuseppe y Piero, por ser unos grandes profesionales de la investigación, por ayudarme en todo, tanto dentro como fuera del labo. Gracias Sere por enseñarme los cultivos primarios. Gracias Piero por enseñarme todos los trucos para trabajar con diversos cultivos celulares con precisión y eficiencia, gracias a lo cual éramos capaces de poder disfrutar del final de la tarde milanese habiendo realizado previamente un gran trabajo. Por enseñarme y confiar en mí. Gracias Giuseppe por darme una mano con todo aquello que me era ajeno, por formar ese fantástico grupo de "aperitivos milaneses". Gracias Mary, Elisa, Louise, Luigi, Chiara, Piero y Giuseppe, por ser mi familia durante esos tres meses, por vuestra amabilidad, apoyo y

preocupación, porque conseguisteis que quisiera retrasar mi vuelta a Valencia lo máximo posible. Porque sois fantásticos. GRACIAS.

Gracias a mis amigos del grupo "LQV" por los grandes momentos vividos. Por ser parte de mi otro mundo que nada tiene que ver con esto. Por estar siempre ahí, dispuestos a proporcionarme la desconexión necesaria. Por vuestra fiel amistad. GRACIAS.

Gracias a mi grupete del COM, por ayudarme a darle sentido a la vida. GRACIAS.

Gracias al Dr. Vicente Muriach, por su apoyo y opinión crítica. Por sus sabios consejos. GRACIAS.

Por último, quiero sobretodo agradecer el apoyo de toda mi familia. En especial de mis hermanos y cuñados (Marta, Borja, Encar, Juan Carlos, Pedro, Paloma, Jose Luis y mi alma gemela, María). No podría numerar la infinita ayuda que he recibido de vuestra parte, pero me gustaría agradecer la confianza que siempre depositáis en mi, por escucharme, apoyarme, por ser mi vía de escape, por regalarme vuestro tiempo y consejos, por esa maravillosa sobrina, por ponerle humor a esta locura, por mimarme como siempre lo hacéis, por llamarme pesada cuando hacía falta con el fin de conseguir que desconectase del labo, por hacerme sentir especial. Por quererme con locura como yo lo hago. GRACIAS.

Además, tengo la suerte de encontrar en la familia a Sole, mi prima, amiga, aliada, compañera de cole, de instituto, de piso de estudiantes, de facultad, de alegrías y tristezas. No me hubiesen podido hacer un regalo mayor que poder compartir parte de esta aventura contigo, porque estando a tu lado todo es más fácil. Gracias por ayudarme en todo momento. Eres única. GRACIAS.

Pero durante estos 27 años mi ejemplo han sido mis padres. Gracias mamá y papá por estar conmigo en esto de "la tesis" a pesar de no comprender muchas de las cosas. Por apoyar siempre mis decisiones aún con exigencia. Gracias mamá por saber sacar siempre de mí una carcajada, incluso cuando lo veo todo negro, gracias papá por esas caricias de apoyo. Pero sobre todo gracias a los dos por enseñarme a poner AMOR en todas las cosas de la vida. MUCHAS GRACIAS.

A MI FAMILIA

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	7
INTRODUCCIÓN	9
1. Superficies cerebrales	11
2. Función y estructura de la corteza cerebral	12
2.1. Funciones de la corteza cerebral	12
2.2. Estructura de la corteza cerebral	14
1. Capa molecular	14
2. Capa granular externa	15
3. Capa piramidal	15
4. Capa granular interna	15
5. Capa ganglionar	15
6. Capa multiforme	15
2.3. Definición y clasificación de las células en el sistema nervioso central	15
-Neuronas	15
-Astroцитos	16
-Oligodendrocitos	18
-Microglíocitos	18
-Células ependimarias	19
3. Importancia de la barrera hematoencefálica en el sistema nervioso central	20
4. Lesiones cerebrales	22
4.1. Estudio de lesión cerebral focal mediante un modelo de criolesión	24
5. Estrés oxidativo tras lesión cerebral focal	25
5.1. Los radicales libres	25
5.2. Papel fisiológico y fisiopatológico de los radicales libres	26
5.3. Modelos de estrés oxidativo es estudios de daño neural	26
5.4. Defensa antioxidante tras daño neural	30
6. Capacidad regenerativa del sistema nervioso	31
6.1. Neurogénesis en el sistema nervioso central durante estadios adultos	31
6.2. Angiogénesis en el sistema nervioso central durante estadios adultos	34
6.3. Neurogénesis y angiogénesis tras daño en el sistema nervioso central	35
7. Estrategias de rescate, reparación y regeneración tisular en el sistema nervioso central	36
7.1. Terapia antioxidante	37
7.1.1. Definición del ácido lipoico	38
7.1.2. Biodisponibilidad y toxicidad del ácido lipoico	39
7.1.3. Propiedades del ácido lipoico	40
7.1.4. Uso terapéutico del ácido lipoico en el sistema nervioso	40

7.2. Terapia celular	41
7.2.1. Células madre: Definición y propiedades	42
7.2.2. Células madre: Tipos y orígenes	43
7.2.3. Células derivadas de la médula ósea	45
7.2.4. Aplicación de la terapia celular en el sistema nervioso	46
7.3. Uso de biomateriales con fines reparativos	48
HIPÓTESIS	49
OBJETIVOS	53
MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. Animales de experimentación	59
1.1. Condiciones de estabulación y manejo de los animales	59
1.2. Distribución y número de animales usados	60
1.2.1. Modelo de tratamiento con ácido lipoico en situación de estrés oxidativo <i>in vitro</i>	60
1.2.2. Modelo de tratamiento con ácido lipoico en situación de peroxidación lipídica <i>ex vivo</i>	60
1.2.3. Modelo de tratamiento con ácido lipoico tras criolesión a corto y largo plazo <i>in vivo</i>	60
1.2.4. Modelo de tratamiento con ácido lipoico y células derivadas de la médula ósea tras criolesión <i>in vivo</i>	60
2. Diseño experimental y metodología	60
2.1. Estudio <i>in vitro</i>	61
2.1.1. Cultivos celulares	61
2.1.1.1. Realización del cultivo primario de la corteza cerebral	61
2.1.1.2. Administración de los estresores celulares y el ácido lipoico mediante post-tratamiento	61
2.2. Estudio <i>ex vivo</i>	63
2.2.1. Modelo de inducción de la peroxidación lipídica en homogenado de cerebro de ratón	63
2.3. Estudio <i>in vivo</i>	64
2.3.1. Modelo de criolesión	64
2.3.2. Administración de ácido lipoico	67
2.3.3. Administración de bromodesoxiridina	68
2.3.4. Extracción de células derivadas de la médula ósea	68
2.3.5. Inyección/trasplante intracerebral de células derivadas de la médula ósea	69
3. Obtención y procesado de muestras	69
3.1. Obtención de muestras para determinaciones bioquímicas	69
3.2. Obtención de muestras para determinaciones inmunohistoquímicas	69
3.2.1. Perfusión con paraformaldehído al 4%	69
3.3. Obtención de muestras para microscopía electrónica	70
4. Procedimientos y técnicas	71

4.1. Estudio <i>in vitro</i>	71
4.1.1. Determinación de la viabilidad celular mediante MTT	71
4.1.2. Determinación de la viabilidad celular mediante inmunofluorescencia de ioduro de propidio/hoechst	71
4.2. Estudio <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i>	72
4.2.1. Determinaciones bioquímicas	72
4.2.1.1. Determinación de proteínas (Método de Lowry)	72
4.2.1.2. Determinación de las concentraciones de glutatión, glutatión disulfuro y glutamato	73
4.3. Estudio <i>ex vivo</i>	74
4.3.1. Determinaciones bioquímicas	74
4.3.1.1. Determinación de la concentración de Malondialdehído	74
4.4. Estudio <i>in vivo</i>	76
4.4.1. Determinaciones bioquímicas	76
4.4.1.1. Determinación de proteínas (Método de Bradford)	76
4.4.1.2. Electroforesis y Western blot para: Caspasa 3, COL4A2, BDNF, TNF alpha, NFkB	76
4.4.2. Tinción de hematoxilina-eosina	79
4.4.3. Determinaciones inmunohistoquímicas	79
4.4.3.1. Técnica de inmunoperoxidasa	79
4.4.3.1.1. Inmunohistoquímica para BrdU	79
4.4.3.1.2. Inmunohistoquímica para Iba1, GFAP, Collagen IV	81
4.4.3.2. Técnica de inmunohistoquímica de fluorescencia	82
4.4.3.2.1. Inmunohistoquímica de fluorescencia simple: GFAP, ED1, Collagen IV y MAP2	82
4.4.3.2.2. Inmunohistoquímica de fluorescencia de doble marcaje: CollagenIV/BrdU, GFAP/BrdU, Iba1/BrdU y MAP2/BrdU	82
5. Obtención y tratamiento de los resultados	83
5.1. Obtención de imágenes	83
5.1.1. Microscopía de campo claro	83
5.1.2. Microscopía de fluorescencia y confocal	83
5.1.3. Microscopía electrónica de transmisión	83
5.2. Contaje y análisis estadístico	83
5.2.1. Estudio <i>in vitro</i>	83
5.2.2. Estudio <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i>	84
RESULTADOS	87
1. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto del ácido lipoico sobre la viabilidad celular y el daño oxidativo en células sometidas a estrés	89
1.1. Estudio de la viabilidad celular tras el uso de diferentes estresores celulares y el post-tratamiento con ácido lipoico en cultivos primarios de la corteza cerebral.....	89

1.2. Estudio del estrés oxidativo tras el uso de diferentes estresores celulares y el post-tratamiento con ácido lipoico en cultivos primarios de la corteza cerebral	92
2. Evaluación <i>ex vivo</i> del tratamiento con ácido lipoico en una situación de estrés oxidativo provocada químicamente	94
3. Efecto <i>in vivo</i> del tratamiento con ácido lipoico como estrategia reparativa tras el modelo de criolesión a corto y largo plazo	98
3.1. Caracterización histológica del área dañada	98
3.2. Análisis de la reactividad glial tras el tratamiento con ácido lipoico	100
3.2.1. Análisis de la reactividad astrogliar tras el tratamiento con ácido lipoico	100
3.2.2. Análisis de la reactividad microglial tras el tratamiento con ácido lipoico	101
3.3. Estudio angiogénico tras el tratamiento con ácido lipoico	104
3.4. Análisis de la presencia de neuronas tras el tratamiento con ácido lipoico	105
4. Estrategia de terapia celular y farmacológica tras daño celular por criolesión	107
4.1. Caracterización histológica del área dañada	107
4.2. Presencia y distribución de las células derivadas de la médula ósea	108
4.3. Análisis del efecto del tratamiento celular y farmacológico en la muerte celular	109
4.4. Determinación de la presencia de células nuevas en el área dañada	110
4.5. Caracterización molecular de las células nuevas	112
4.6. Análisis del efecto del tratamiento celular y farmacológico en la cuantificación y distribución glial	113
4.6.1. Análisis del efecto del tratamiento celular y farmacológico en la cuantificación y distribución astrogliar	113
4.6.2. Análisis del efecto del tratamiento celular y farmacológico en la cuantificación y distribución microglial	116
4.7. Determinación de la presencia de citoquinas y factores neurotróficos en el área dañada tras el tratamiento celular y farmacológico	118
4.8. Estudio angiogénico tras el tratamiento celular y farmacológico	120
4.9. Análisis de la presencia de neuronas tras el tratamiento celular y farmacológico	122
DISCUSIÓN	125
1. Efecto del tratamiento con ácido lipoico sobre la viabilidad celular ante el estrés por daño oxidativo	127
2. Terapia farmacológica con ácido lipoico tras daño focal en sistema nervioso central. Efectos celulares y tisulares tras el tratamiento	131
2.1. Idoneidad del modelo de criolesión y respuesta al tratamiento farmacológico con ácido lipoico	131
2.2. Respuesta astrogliar ante un tratamiento farmacológico con ácido lipoico	132
2.3. Respuesta microglial ante un tratamiento farmacológico con ácido lipoico	134
2.4. Respuesta angiogénica ante un tratamiento farmacológico con ácido lipoico ..	135

2.5. Respuesta neuronal ante un tratamiento farmacológico con ácido lipoico	136
3. Combinación de terapia celular y farmacológica con fines de reparación	138
3.1. Idoneidad de la terapia celular empleada con fines de reparación tras daño cerebral focal	138
3.2. Aumento de la proliferación celular como respuesta a la combinación de terapia celular y farmacológica tras daño cerebral focal	141
3.3. Respuesta astrogliial ante la combinación de terapia celular y farmacológica tras daño cerebral focal	141
3.4. Respuesta microglial e inflamatoria ante la combinación de terapia celular y farmacológica tras daño cerebral focal	142
3.5. Respuesta microglial en el tiempo ante la combinación de terapia celular y farmacológica tras daño cerebral focal	144
3.6. Respuesta angiogénica ante la combinación de terapia celular y farmacológica tras daño cerebral focal	145
3.7. Respuesta neuronal ante la combinación de terapia celular y farmacológica tras daño cerebral focal	146
CONCLUSIONES	147
BIBLIOGRAFÍA	151
ANEXO I	183
ANEXO II	199
ANEXO III	209

LISTA DE ABREVIATURAS

aCM: Células madre adultas
aCMN: Células madre neurales adultas
BDNF (Brain-derived neurotrophic factor): Factor neurotrófico derivado del cerebro
BHE: Barrera hematoencefálica
BMDC (Bone marrow derived cells): Células derivadas de la médula ósea
BSO: L-Butionina-S,R-sulfoximina
CC: Cavidad cística
CM: Célula madre
CMM: Células madre mesenquimales
CMR: Corriente migratoria rostral
DAB: Diaminobencidina
DHLA (Dihydrolipoic acid): Dihidrolipoico
DZ (Damaged zone): Zona dañada
EGC (Embryonic germ cells): Células madre embrionarias germinales
ERO: Especies reactivas de oxígeno
ESC (Embryonic stem cells): Células madre embrionarias
FBS (Fetal bovine serum): Suero fetal bovino
FGF (Fibroblast growth factor): Factor de crecimiento de fibroblastos
GFAP (Glial fibrillary acidic protein): Proteína ácida glial fibrilar
GFP (Green fluorescent potein): Proteína verde fluorescente
GS (Glial scar): Cicatriz glial
GSH: Glutación
GSSG: Glutación disulfuro
HE: Hematoxilina - eosina
HGF (Hepatocyte growth factor): Factor de crecimiento de hepatocitos
HPLC (High pressure liquid chromatography): Cromatografía líquida de alta eficacia
HSC (Hematopietic stem cells): Células madre hematopoyéticas
IFN γ : Interferón gamma
IGF 1 (Insulin-like growth factor 1): Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL-1 β : Interleuquina 1 β
IL-10: Interleuquina 10
IL-12: Interleuquina 12
IL-6: Interleuquina 6
iNOS (Inducible nitric oxide synthase): Óxido nítrico sintasa inducible
iPSC (Induced pluripotent stem cells): Células madre pluripotentes inducidas
IZ (Intact zone): Zona no afectada
LA (Lipoic acid): Ácido lipoico
LPS: Lipopolisacárido
LV (Lateral ventricle): Ventrículo lateral
MDA: Malondialdehído

MEC: Matriz extracelular
NFκB (Nuclear factor kappa B): Factor nuclear Kappa B
NGF (Nerve growth factor): Factor de crecimiento nervioso
NO (Nitric oxide): Óxido nítrico
OB (Olfactory bulb): Bulbo olfatorio
ON (Over night): Toda la noche
PB (Phosphate buffer): Tampón fosfato
PBS (Phosphate buffered saline): Tampón fosfato salino
PDGF (Platelet derived growth factor): Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PFA: Paraformaldehído
PI (Propidium iodide): Ioduro de propidio
RT (Room temperature): Temperatura ambiente
SGZ (Subgranular zone): Zona subgranular
SNC: Sistema nervioso central
SNP: Sistema nervioso periférico
SVZ (Subventricular zone): Zona subventricular
TB: Tampón de bloqueo
TCE: Traumatismo craneoencefálico
TGFβ (Transforming growth factor beta): Factor de crecimiento transformante β
TNFα (Tumor necrosis factor alpha): Factor de necrosis tumoral α
VEGF (Vascular endothelial growth factor): Factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto general de los hemisferios cerebrales	11
Figura 2. Vista lateral del cerebro	13
Figura 3. Capas de la corteza cerebral	14
Figura 4. Neuronas de la corteza cerebral de un ratón marcadas con el anticuerpo de proteína asociada a los microtúbulos (MAP2)	16
Figura 5. Imagen de un astrocito de la corteza cerebral de un ratón obtenida mediante el marcaje de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	17
Figura 6. Imagen de una célula de oligodendroglía de la corteza cerebral de un ratón GFP	18
Figura 7. Imagen de una célula de microglía de la corteza cerebral de un ratón marcado con la proteína 1 de unión a calcio (Iba1)	18
Figura 8. Imagen de una tinción de hematoxilina-eosina de las células endimarias con los cilios hacia el interior del ventrículo	20
Figura 9. Esquema de la BHE	21
Figura 10. Estructura química del BSO	27
Figura 11. Estructura química de la Dopamina	28
Figura 12. Estructura de la capa externa de bacterias Gram-negativas	29
Figura 13. Neurogénesis en la SVZ del cerebro adulto	33
Figura 14. Estructura química de los enantiómeros R y S del ácido lipoico	38
Figura 15. Tipos de células madre según su origen	44
Figura 16. Esquema representativo de la médula ósea y del conjunto de células provenientes de la médula ósea, tanto células hematopoyéticas como células mesenquimáticas	46
Figura 17. Desarrollo experimental del modelo de tratamiento con ácido lipoico en situación de estrés oxidativo <i>in vitro</i>	62
Figura 18. Desarrollo experimental del modelo de la peroxidación lipídica en homogenado de cerebro de ratón	64
Figura 19. Desarrollo experimental del modelo de tratamiento con LA como estrategia reparativa tras CR en la corteza cerebral a corto plazo (15 días)	64
Figura 20. Desarrollo experimental del modelo de tratamiento con LA como estrategia reparativa tras CR en la corteza cerebral a largo plazo (60 días)	65
Figura 21. Posición de la criolesión en rata	66
Figura 22. Desarrollo experimental del modelo de trasplante de BMDC y tratamiento con LA como estrategia reparativa tras CR en la corteza cerebral	66
Figura 23. Posición de la criolesión en ratón	67
Figura 24. Fotografías del cultivo primario de la corteza cerebral realizado con ratones C57BL/6 PNO	89
Figura 25. Efecto del LA utilizado como post-tratamiento en la toxicidad mediada por el LPS y Dopamina	90

Figura 26. Efecto del LA utilizado como post-tratamiento en la toxicidad mediada por BSO	91
Figura 27. Efecto del LA utilizado como post-tratamiento en la toxicidad celular mediada por LPS y Dopamina, así como BSO, sobre la concentración de GSH (nmol/mg prot) determinado por HPLC	92
Figura 28. Efecto del LA utilizado como post-tratamiento en la toxicidad celular mediada por LPS y Dopamina, así como BSO, sobre la concentración de GSSG (nmol/mg prot) determinado por HPLC	93
Figura 29. Efecto del LA utilizado como post-tratamiento en la toxicidad celular mediada por LPS y Dopamina, así como BSO, sobre el ratio de GSH (nmol/mg prot)/GSSG (nmol/mg prot) determinado por HPLC	93
Figura 30. Efecto del LA utilizado como post-tratamiento en la toxicidad celular mediada por LPS y Dopamina, así como BSO, sobre la concentración de glutamato (nmol/mg prot) determinado por HPLC	94
Figura 31. Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de LA (0-0,5-1-2-4 y 10 μ M) en homogenados de cerebro sobre la concentración de GSH (nmol/mg prot) determinado por HPLC	95
Figura 32. Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de LA (0-0,5-1-2-4 y 10 μ M) en homogenados de cerebro sobre la concentración de GSSG (nmol/mg prot) determinado por HPLC	95
Figura 33. Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de LA (0-0,5-1-2-4 y 10 μ M) en homogenados de cerebro sobre el ratio de GSH (nmol/mg prot)/GSSG (nmol/mg prot) determinado por HPLC	96
Figura 34. Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de LA (0-0,5-1-2-4 y 10 μ M) en homogenados de cerebro sobre la concentración de glutamato (nmol/mg prot) determinado por HPLC	97
Figura 35. Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de LA (0-0,5-1-2-4 y 10 μ M) en homogenados de cerebro sobre la concentración de MDA (nmol/mg prot) determinado por HPLC	98
Figura 36. Caracterización histológica del área dañada en rata	99
Figura 37. Tinción de HE que muestra el área dañada de (A) animales no tratados sacrificados 60 días tras la CR y (B) animales tratados con LA y sacrificados 60 días tras la CR	100
Figura 38. Inmunofluorescencia para GFAP (astrocitos en verde) en (A) animales no tratados y (B) animales tratados, 60 días tras la CR	101
Figura 39. Cuantificación del área ocupada por los astrocitos a los 15 y 60 días tras la CR (% Área GFAP)	101
Figura 40. Inmunohistoquímica para Iba1 (microglia) a los 15 y 60 días tras la CR	102
Figura 41. Cuantificación de la densidad celular de las células microgliales (n° células Iba1 ⁺ /mm ²)	103
Figura 42. Inmunofluorescencia para el marcador ED1 (rojo) a los 15 y 60 días tras la CR	103

Figura 43. Inmunofluorescencia para Colágeno IV a los 60 días tras la CR	104
Figura 44. Inmunofluorescencia para MAP2 a los 15 y 60 días tras la CR	106
Figura 45. Caracterización histológica del área dañada en ratón	107
Figura 46. Distribución de las BMDC GFP ⁺ trasplantadas en la zona lesionada 8 días tras la CR	108
Figura 47. Análisis de la muerte celular tras tratamiento celular y farmacológico	110
Figura 48. Presencia de células nuevas en el área lesionada 8 días tras la CR	111
Figura 49. Caracterización molecular de las nuevas células encontradas tras el tratamiento farmacológico y celular en el área lesionada 8 días tras la CR	112
Figura 50. Gráfico que muestra la cuantificación en el área lesionada de la colocación celular (% de colocación celular) en cada uno de los grupos experimentales	113
Figura 51. Presencia de astrocitos tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 8 días tras la CR	114
Figura 52. Presencia de astrocitos tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada de animales sacrificados 16 días tras la CR	115
Figura 53. Presencia de microglía tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 8 días tras la CR	116
Figura 54. Presencia de microglía tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 16 días tras la CR	117
Figura 55. Presencia de NFκB tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 8 días tras la CR	118
Figura 56. Presencia de TNFα tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 8 días tras la CR	119
Figura 57. Presencia de BDNF tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 8 días tras la CR	120
Figura 58. Angiogénesis tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 8 días tras la CR	121
Figura 59. Presencia de COL4A2 tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 8 días tras la CR	121
Figura 60. Inmunofluorescencia doble para MAP2 (verde) y BrdU (rojo) en cada uno de los grupos de estudio 8 días tras la CR	123
Figura 61. Comparación estadística de la cuantificación de las células Iba 1 ⁺ tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 8 y 16 días tras la CR	144

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios utilizados para WB	78
Tabla 2. Lista de anticuerpos secundarios utilizados para WB	78
Tabla 3. Lista de anticuerpos primarios utilizados para técnicas de inmunohistoquímica ...	80
Tabla 4. Lista de anticuerpos secundarios utilizados para técnicas de inmunohistoquímica	81
Tabla 5. Tabla en la que se presenta la concentración de MDA (nmol/mg proteína) determinada por HPLC a las diferentes concentraciones de LA (0-0,5-1-2-4 y 10 μ M) \pm la desviación estándar	97

INTRODUCCIÓN

1. Superficies cerebrales

El cerebro está dividido en los hemisferios derecho e izquierdo por una cisura longitudinal. Cada hemisferio tiene tres superficies: superolateral, medial e inferior, contando todas ellas con cisuras irregulares o surcos que separan las circunvoluciones (Figura 1). Aunque existen variaciones en la disposición entre ambos hemisferios en el mismo cerebro y en el de diferentes personas, una similitud básica en el patrón permite que las partes diferentes del cerebro puedan ser localizadas y nombradas (Netter, 2005).

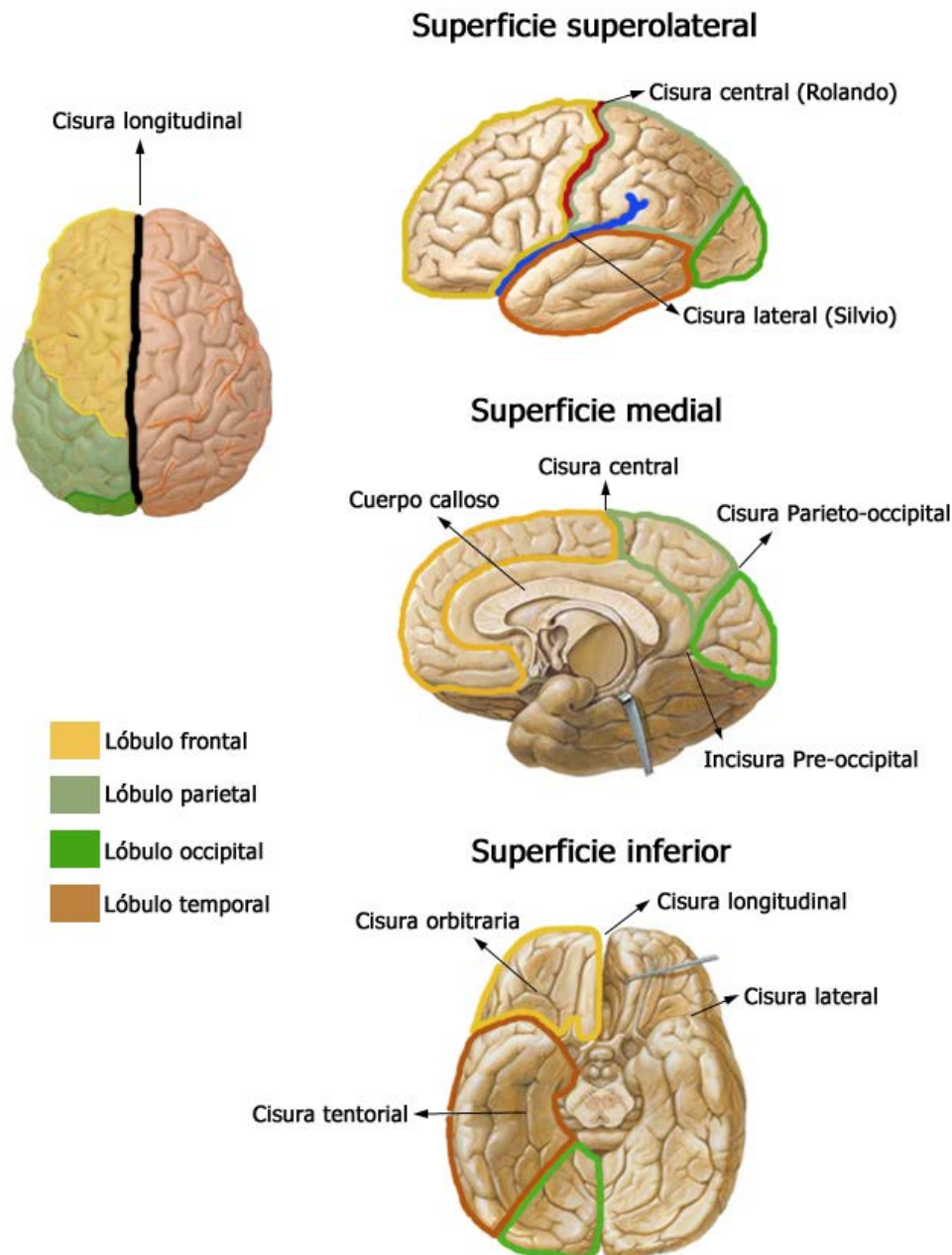


Fig.1. Aspecto general de los hemisferios cerebrales. Se presenta una vista superior de los hemisferios cerebrales. Una vista superolateral del hemisferio cerebral izquierdo, una vista medial del hemisferio cerebral derecho y una vista inferior del encéfalo. Adaptado de (Micheau and Hoa, 2009).

Sobre la superficie supero-lateral, pueden identificarse fácilmente dos cisuras, la lateral o de Silvio (en azul) y la central o de Rolando (en rojo). Por otra parte, la cisura parieto-occipital y la incisura pre-occipital están situadas principalmente sobre la superficie medial del cerebro. Estas estructuras mencionadas dividen el cerebro en cuatro lóbulos, que reciben sus nombres según los huesos del cráneo debajo de los cuales se localizan: lóbulos frontal, parietal, occipital y temporal (Netter, 2005, Silverthorn, 2008).

La superficie medial de los hemisferios cerebrales es plana, y aunque está separada en gran medida por la cisura longitudinal y la hoz del cerebro, está unida en algunas partes por las comisuras cerebrales y por las estructuras que limitan el III ventrículo. En ella encontramos el cuerpo caloso que es la mayor de las comisuras cerebrales, y constituye la principal porción del techo del ventrículo lateral. En una sección sagital media aparece como un puente aplanado de fibras blancas, y su parte central, o tronco, es convexo hacia arriba.

Por otra parte, la superficie inferior está dividida por la porción principal de la cisura lateral, la orbitaria y la tentorial (Netter, 2005).

El cerebro tiene distintas regiones de sustancia gris y sustancia blanca. La sustancia gris puede ser dividida en tres regiones principales: la corteza, los ganglios basales y el sistema límbico. La corteza cerebral es la capa externa del cerebro y sólo tiene algunos milímetros de espesor (Snell, 2007, Silverthorn, 2008). La sustancia blanca del cerebro se encuentra principalmente en el interior. Los haces de fibras permiten que diferentes regiones de la corteza se comuniquen entre ellas y transfieran la información de un hemisferio al otro, fundamentalmente a través del cuerpo caloso (Silverthorn, 2008).

2.Función y estructura de la corteza cerebral

2.1. Funciones de la corteza cerebral

En humanos, la corteza cerebral está altamente desarrollada y la complejidad de las conexiones interhemisféricas e intrahemisféricas es similar a este grado de desarrollo (Netter, 2005). La corteza cerebral ha sido dividida en dos tipos fundamentales: el isocortex y el allocortex.

El isocortex o neocórtex corresponde a aquella parte de la corteza en la que siempre puede reconocerse la estratificación en seis capas, mientras que el allocortex, representado por el archicórtex (hipocampo y *fascia detata*) y paleocortex (corteza olfativa propiamente dicha), exhiben una estructura laminar simple compuesta por tres capas. Ambos tipos corticales están más o menos separados por cierto número de áreas paracorticales que han sido objeto de gran interés en el estudio de la evolución cortical (Valverde, 2002).

La corteza cerebral está compuesta por sustancia gris y al igual que la sustancia gris de cualquier otra parte del sistema nervioso central (SNC), consiste en un conjunto de células nerviosas, fibras nerviosas, neuroglía y vasos sanguíneos (Snell, 2007).

La corteza cerebral tiene áreas definidas relacionadas con funciones neurológicas específicas, tanto para la recepción sensitiva primaria como para la actividad integrada

compleja. Cuando un área cortical es activada por un estímulo, responden también otras áreas, debido a su rápida estimulación a lo largo de un gran número de vías de asociación organizadas con gran precisión y que interaccionan recíprocamente.

A continuación, se describirán las áreas principales denominadas según su ubicación anatómica (Netter, 2005):

En el lóbulo frontal se distinguen la corteza prefrontal, la motora y la sensitiva. La corteza prefrontal está relacionada con las funciones mentales superiores, participando en muchos aspectos del comportamiento humano, y así, las lesiones bilaterales del área prefrontal producen una pérdida de la capacidad de concentración, disminución de la capacidad intelectual y trastornos de la memoria y el criterio. Por otra parte, tanto la corteza somatosensitiva, que ocupa partes contiguas de los lóbulos frontal y parietal, precisamente nuestra zona de estudio mediante la producción de lesión local, como la corteza premotora del lóbulo frontal, están relacionadas con la iniciación, activación y puesta en marcha de la actividad motora, y la recepción de sensaciones primarias del cuerpo (Figura 2). Las lesiones de la corteza somatosensitiva dan lugar a una parálisis y pérdida de la recepción o percepción somatosensitiva contralateral. El lóbulo parietal se encarga especialmente de la interpretación e integración de la información procedente de las áreas sensoriales, es decir, áreas visuales y corteza somatosensitiva.

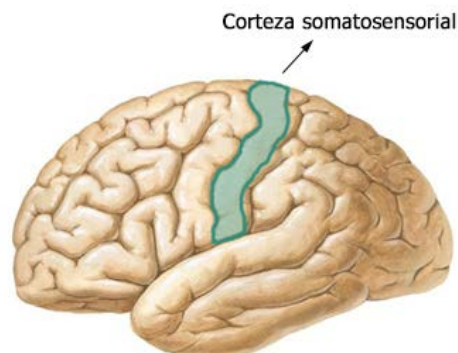


Fig.2. Vista lateral del cerebro. Se presenta en color verde la corteza somatosensorial (zona de estudio en esta tesis doctoral) localizada en la porción posterior al surco central. Adaptado de (Netter, 2005).

Las lesiones del lóbulo parietal dan lugar a una ataxia sensitiva, una pérdida de las nociones sensitivas generales, una identificación defectuosa de los impulsos sensitivos y una falta de interpretación de las relaciones espaciales. Por otra parte, la porción posterior del lóbulo temporal se encarga de la recepción e interpretación de la información auditiva y de algunos aspectos del patrón de identificación y coordinación visual superior. Además, la porción anterior del lóbulo temporal está vinculada a la actividad motora visceral y a algunos aspectos de la conducta. Las lesiones en esta zona pueden manifestarse a través de crisis psicomotoras o de crisis uncinadas (Netter, 2005). Por último, el lóbulo occipital es el área visual primaria (Snell, 2007).

Una lesión en un área específica de la corteza cerebral puede producir un déficit que sobrepase la identidad funcional de determinada área, ya que las interconexiones complejas que subyacen en esta región cortical pueden haberse lesionado (Netter, 2005).

2.2. Estructura de la corteza cerebral

El neocortex de la corteza cerebral humana se divide en capas que pueden distinguirse conforme a los tipos, la densidad y la disposición de sus células (Figura 3). En ellas se encuentran los siguientes tipos de células nerviosas: células piramidales, cuyo nombre se debe a la forma de sus cuerpos; células estrelladas, también denominadas células granulosas debido a su pequeño tamaño; células fusiformes, células horizontales de Ramón y Cajal y células de *Martinotti* (Snell, 2007).

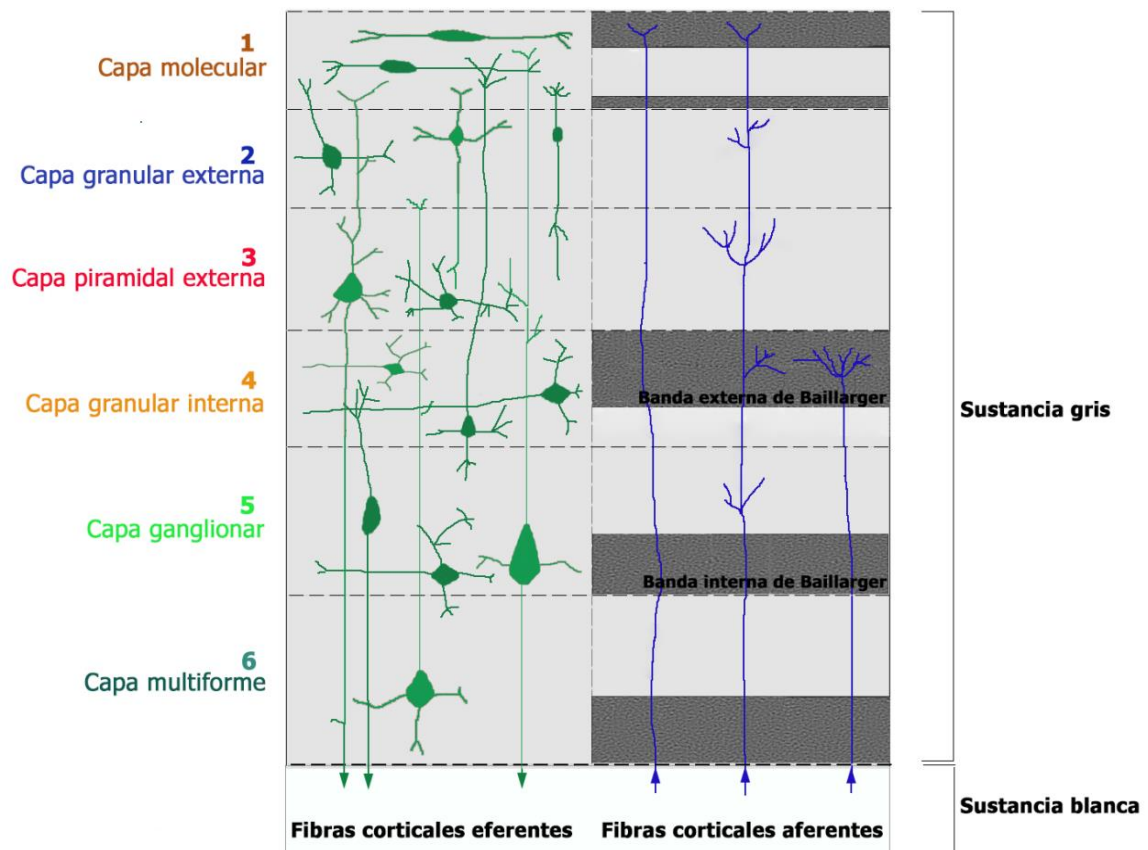


Fig.3. Capas de la corteza cerebral. Se muestran las neuronas a la izquierda y las fibras nerviosas a la derecha. Adaptado de (Snell, 2007).

Las seis capas en las que se fundamenta la corteza cerebral son las siguientes:

1. Capa molecular (capa plexiforme). Es la capa más superficial (Estrada and Uribe, 2002). Consiste en una red densa de fibras nerviosas orientadas tangencialmente que derivan de las dendritas apicales de las células piramidales y fusiformes, los axones de las células estrelladas y las células de *Martinotti*.

También hay fibras aferentes que se originan en el tálamo y se asocian con fibras comisurales. Hay algunas células horizontales de Ramón y Cajal. En esta capa se establece una gran cantidad de sinapsis entre diferentes neuronas.

2. Capa granular externa. Contiene un gran número de pequeñas células piramidales y células estrelladas. Las dendritas de estas células terminan en la capa molecular y los axones entran en las capas más profundas, donde terminan o bien continúan hasta entrar en la sustancia blanca del hemisferio cerebral.

3. Capa piramidal externa. Compuesta por células piramidales. Las dendritas apicales pasan hacia la capa molecular y los axones entran en la sustancia blanca como fibras de proyección, de asociación o comisurales.

4. Capa granular interna. Constituida por células estrelladas dispuestas de forma muy compacta. Hay una concentración elevada de fibras de disposición horizontal conocidas en conjunto como la banda externa de Baillarger.

5. Capa ganglionar (capa piramidal interna). Contiene células piramidales muy grandes y de tamaño intermedio. Dispersas entre las células piramidales hay células estrelladas y células de *Martinotti*. Además, hay una gran cantidad de fibras dispuestas horizontalmente que forman la banda interna de Baillarger. En la corteza motora de la circunvolución precentral las células piramidales de esta capa son muy grandes y se conocen como células Betz. Estas células dan origen a alrededor del 3% de las fibras de proyección del tracto corticoespinal o piramidal (Kiernan, 2000, Snell, 2007, Ross and Pawlina, 2012).

6. Capa multiforme (capa de células polimorfas). Es llamada así por la amplia variedad de formas que contiene (Estrada and Uribe, 2002). Aunque la mayoría de las células son fusiformes, muchas son células piramidales modificadas de cuerpo triangular u ovoide. Las células de *Martinotti* también se pueden ver en esta capa. Hay muchas fibras nerviosas que entran en la sustancia blanca subyacente o salen de ella (Kiernan, 2000, Snell, 2007, Ross and Pawlina, 2012).

2.3. Definición y clasificación de las células en el sistema nervioso central

El tejido nervioso se compone principalmente de dos tipos de células: las neuronas y las células de sostén. Pero, además de las neuronas y las células de sostén, tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico (SNP) existe un componente vascular extenso.

Los vasos sanguíneos están separados del tejido nervioso por las láminas basales y una cantidad variable de tejido conjuntivo, según el tamaño del vaso (Ross and Pawlina, 2012).

-Las neuronas son la unidad estructural y funcional del tejido nervioso. Están especializadas para recibir estímulos de otras neuronas y conducir los impulsos eléctricos a otras partes del tejido nervioso a través de sus prolongaciones (Figura 4).

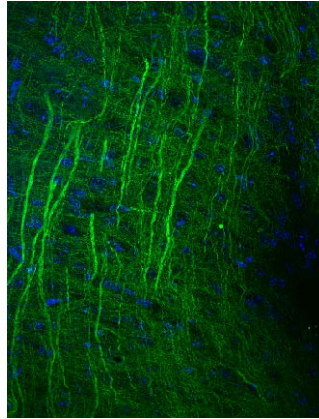


Fig.4. *Neuronas de la corteza cerebral de un ratón marcadas con el anticuerpo de proteína asociada a los microtúbulos (MAP2).*

-Las células de sostén son células no conductoras que están en contacto estrecho con las neuronas. En el SNC se llaman células neuróglicas, neuroglía o sólo glía (Ross and Pawlina, 2012). En general, son más pequeñas que las neuronas y las superan de 5 a 10 veces en número; constituyendo aproximadamente el 50% del volumen total del encéfalo y la medula espinal (Snell, 2007). Las funciones de los diversos tipos de células neuróglicas comprenden:

- Sostén físico para las neuronas.
- Aislamiento eléctrico para los somas y las prolongaciones de las neuronas que facilita la transmisión rápida de los impulsos nerviosos.
- Separación de la lesión neuronal
- Regulación del medio líquido interno del SNC.
- Eliminación de los neurotransmisores de las hendiduras sinápticas.
- Mecanismos de intercambio metabólico entre el sistema vascular y las neuronas del sistema nervioso.

El SNC contiene cuatro tipos de células neuróglicas: astrocitos, oligodendrocitos, microglíocitos y células endoteliales.

-Los astrocitos: Tienen cuerpos celulares pequeños con prolongaciones que se ramifican y se extienden en todas direcciones (Figura 5) (Snell, 2007). Algunos astrocitos se extienden a través de todo el espesor del encéfalo, con lo cual proveen un andamiaje para las neuronas que migran durante el desarrollo encefálico. Otros astrocitos extienden sus prolongaciones desde los vasos sanguíneos hasta las neuronas, formando los pies perivasculares, que cubren grandes regiones de la superficie externa de un vaso y los pies perineurales, que cubren grandes extensiones de la superficie axónica de las neuronas.

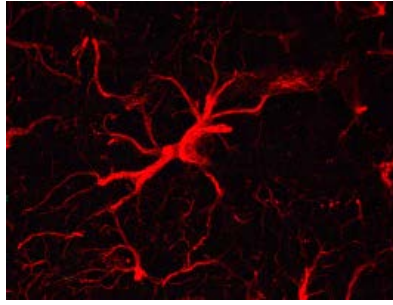


Fig.5. *Imagen de un astrocito de la corteza cerebral de un ratón obtenida mediante el marcaje de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP).*

Se han identificado dos clases de astrocitos:

- Astrocitos protoplasmáticos, que prevalecen en la sustancia gris y que poseen abundantes prolongaciones citoplasmáticas cortas y ramificadas.

- Astrocitos fibrosos, que son más comunes en la sustancia blanca y que tienen menos prolongaciones. Estas son más bien rectas (Ross and Pawlina, 2012), largas, delgadas y lisas (Snell, 2007).

Ambos tipos de astrocitos contienen haces prominentes de filamentos intermedios compuestos de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP; glial fibrillary acidic protein).

Los astrocitos desempeñan papeles importantes en el movimiento de metabolitos y desechos desde las neuronas y hacia ellas, pudiendo actuar como fagocitos. También contribuyen en el mantenimiento de las uniones estrechas de los capilares que forman la barrera hematoencefálica (BHE). Además, los astrocitos proveen una cubierta para las “regiones desnudas” de los axones mielínicos, por ejemplo, a la altura de los nódulos de Ranvier y de las sinapsis (Ross and Pawlina, 2012). Por lo tanto, el soporte de los astrocitos es necesario para la supervivencia neuronal (Min et al., 2012, Jeong et al., 2013).

Los astrocitos almacenan glucógeno dentro de su citoplasma que puede ser degradado a glucosa e incluso a lactato y ser liberado hacia las neuronas circundantes en respuesta a la noradrenalina. Además, se ha sugerido la posibilidad de que los astrocitos secreten citocinas que regulen la actividad de las células inmunitarias que penetran en el sistema nervioso en caso de enfermedad (Snell, 2007, Lu et al., 2009, Gao et al., 2013b).

Pero además de dar soporte a las neuronas y regular su intercambio metabólico al suministrarles glucosa y factores neurotróficos, los astrocitos regulan también el estrés oxidativo y la excitotoxicidad a través de la producción de glutatión, 5-L-glutamyl-L-cisteinglicina (GSH), la absorción de glutamato y potasio y la regulación en el contenido de agua extracelular (Muller and Seifert, 1982, Raps et al., 1989, Rothstein et al., 1996, Tsacopoulos and Magistretti, 1996, Badaut et al., 2002, Chih and Roberts Jr, 2003, Simard and Nedergaard, 2004, Olsen et al., 2006).

Sin embargo, tras un trauma cerebral se puede producir la activación de las células gliales de alrededor de la lesión, formándose una cicatriz glial (GS; glial scar) compuesta por astrocitos reactivos, microglía reactiva y células precursoras gliales, que aunque en sus

primeros estadios limita la extensión de la zona dañada, separando el tejido necrótico del tejido sano, supondrá también una limitación para la posterior regeneración a través de la expresión de moléculas como proteoglicanos de sulfato de condroitina, semaforinas y efrinas (Fitch and Silver, 2008, Duffy et al., 2009, Kawano et al., 2012).

-Los oligodendrocitos son las células encargadas de producir la mielina en el SNC. Bajo el microscopio óptico y teñidos con técnicas especiales, los oligodendrocitos aparecen como células pequeñas con prolongaciones relativamente escasas en comparación con los astrocitos (Figura 6) (Ross and Pawlina, 2012). Los oligodendrocitos también rodean los cuerpos de las células nerviosas (oligodendrocitos satélite) y es probable que tengan una función similar a las de las células satélite o capsulares de los ganglios sensitivos periféricos. Se cree que estos influyen en el medio bioquímico de las neuronas (Snell, 2007).

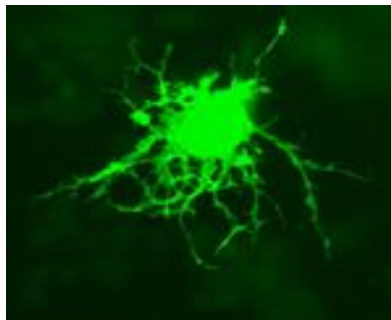


Fig.6. *Imagen de una célula de oligodendroglía de la corteza cerebral de un ratón GFP (Broeke, 2005).*

-Los microglíocitos o células de la microglía: Tienen cuerpos celulares pequeños de los que emergen prolongaciones ondulantes ramificadas con numerosas proyecciones similares a espinas (Figura 7) (Snell, 2007).

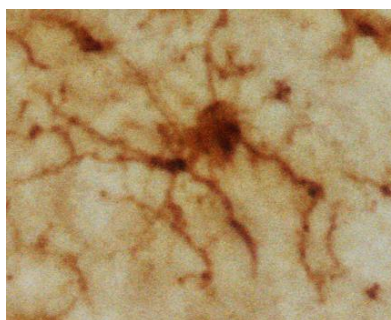


Fig.7. *Imagen de una célula de microglía de la corteza cerebral de un ratón marcado con la proteína 1 de unión a calcio (Iba1).*

En el SNC del adulto, los microglíocitos normalmente constituyen alrededor del 5% de todas las células de la neuroglía. Aunque el origen y linaje celular preciso de las células de microglía permanece todavía en debate, se consideran como los fagocitos mononucleares

residentes que derivan de células progenitoras de granulocitos/monocitos (Ross and Pawlina, 2012).

En este sentido las células microgliales tienen el potencial de actuar como macrófagos considerándose inmunomoduladoras y participando en la regulación de la homeostasis del SNC por fagocitar las neuronas apoptóticas (Ransohoff and Perry, 2009, Graeber and Streit, 2010). Pues se ha descrito que a pesar de que en el encéfalo y la médula espinal normales, las células de la microglía son inactivas y con una morfología ramificada (microglía en reposo) (Snell, 2007), proliferan y se tornan muy fagocíticas adquiriendo una morfología ameboide (microgliocitos reactivos) en las regiones lesionadas o enfermas (Ross and Pawlina, 2012).

Sin embargo, han aparecido nuevas controversias sobre si la microglía tiene un papel activo, cambiando su inmunofenotipo pero sin desempeñar la función de macrófagos o un papel reactivo, desempeñando por lo tanto su papel de macrófagos, en la enfermedad neurodegenerativa. Se han realizado diversos estudios para diferenciar la respuesta inflamatoria de otros procesos bioquímicos en el desarrollo del daño cerebral secundario y para determinar si la respuesta inflamatoria conlleva efectos dañinos o de protección tras un daño cerebral traumático (Bellander et al., 2010).

Puesto que cuando las células microgliales se activan, se lleva a cabo la fagocitosis junto con la liberación de citoquinas incluyendo el factor de necrosis tumoral (TNF α ; tumor necrosis factor alpha), interleuquina-1 β (IL-1 β) y otros mediadores inflamatorios como las especies reactivas de oxígeno (ERO) y el óxido nítrico (NO; nitric oxide) (Nathan, 2002, Hanisch and Kettenmann, 2007, Song et al., 2014). Por una parte, se ha determinado cómo en un modelo de daño cerebral traumático en rata, se produce esta activación microglial que contribuye al estrés oxidativo, neurodegeneración y alteración de la BHE (Readnower et al., 2010, Briones et al., 2011, Xiong et al., 2012). Además, una de las consecuencias del estrés oxidativo ocasionado, es la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana, lo que conlleva un aumento de los aldehídos activos incrementando la permeabilidad de las células endoteliales (Chodobski et al., 2011).

Por el contrario, cuando la microglía lleva a cabo la eliminación de células apoptóticas o restos de mielina, libera factores anti-inflamatorios como la interleuquina-10 (IL-10), el factor de crecimiento transformante β (TGF β ; transforming growth factor beta), prostaglandinas E2 y el factor activador de plaquetas (Fadok et al., 1998, Liu et al., 2006) y causa una reducción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF α , interleuquina-12 (IL-12), IL-1 β y otros mediadores inflamatorios (Fadok et al., 1998, Magnus et al., 2001).

Por lo tanto, dado que la microglía local, los astrocitos y los macrófagos son los principales responsables de la respuesta inmune innata en el SNC (Minagar et al., 2002), es de suma importancia comprender los procesos de la respuesta glial para desarrollar estrategias preventivas y terapéuticas contra el daño cerebral (Chew et al., 2006).

-Las células ependimarias: Son células entre cúbicas y cilíndricas distribuidas en una sola capa que poseen las características morfológicas y funcionales de células transportadoras de líquidos (Figura 8). Revisten las cavidades del encéfalo y el conducto central de la médula espinal (Snell, 2007).

Están estrechamente unidas por complejos de unión ubicados a la altura de sus superficies apicales. A diferencia de un epitelio típico, las células endimarias carecen de lámina basal. La superficie celular basal posee repliegues abundantes que se interdigitan con las prolongaciones de astrocitos contiguos. La superficie apical de las células posee cilios y microvellosidades. Estas últimas intervienen en la absorción de líquido cefalorraquídeo (Ross and Pawlina, 2012).

En varios sitios del sistema ventricular encefálico este revestimiento endimario sufre una modificación adicional para producir el líquido cefalorraquídeo por transporte y secreción de materiales derivados de asas capilares contiguas. Las células endimarias modificadas y los capilares asociados forman en conjunto los llamados plexos coroideos (Ross and Pawlina, 2012).

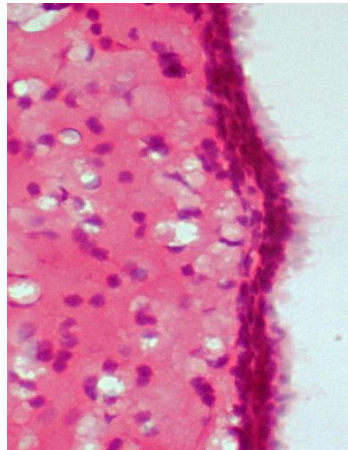


Fig.8. *Imagen de una tinción de hematoxilina-eosina de las células endimarias con los cilios hacia el interior del ventrículo.*

Las células endimarias pueden dividirse en tres grupos:

- Ependimocitos, que revisten los ventrículos del encéfalo y el conducto central de la médula espinal estando en contacto con el líquido cefalorraquídeo.
- Tanicitos, que revisten el piso del tercer ventrículo por encima de la eminencia media del hipotálamo.
- Células epiteliales coroideas, que cubren las superficies de los plexos coroideos (Snell, 2007).

3. Importancia de la barrera hematoencefálica en el sistema nervioso central.

La barrera hematoencefálica (BHE) es una estructura del SNC formada por uniones estrechas, contínuas, de células endoteliales formando capilares, que expresan transportadores de membrana específicos que garantizan la homeostasis y el buen funcionamiento del cerebro (Iadecola, 2004). Estas células endoteliales interactúan con los pedicelos de los astrocitos, con numerosos pericitos y también con microglía, formando lo que

se denomina la “unidad neurovascular” que participa en el mantenimiento y la función de la BHE, y protege las células del cerebro de factores potencialmente tóxicos derivados de la sangre (Figura 9) (Cleaver and Melton, 2003, Ballabh et al., 2004, Iadecola, 2004, Abbott et al., 2006, Shimizu et al., 2008, Nakagawa et al., 2009). Es importante remarcar las uniones continuas de células endoteliales que forman la BHE, diferentes del endotelio presente en los otros tejidos corporales, en los que el endotelio es fenestrado y por ende permeable (Ballabh et al., 2004),

Además, las células endoteliales de la BHE modulan el intercambio iónico entre la sangre y el cerebro a través de transportadores iónicos específicos, regulan el fluido intersticial, suministran diferentes nutrientes al cerebro y previenen de la formación de daños adicionales durante las enfermedades o accidentes cerebrovasculares.

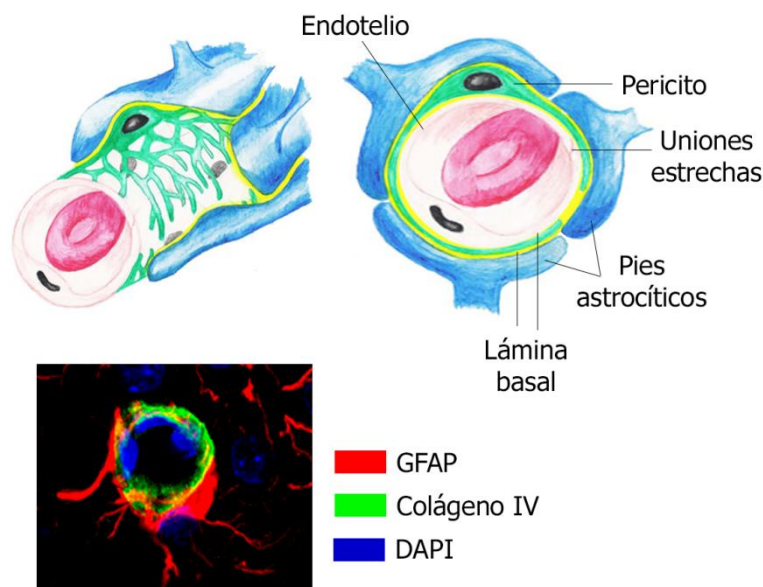


Fig.9. Esquema de la BHE. Se muestran los pericitos (verde) localizados en la periferia de la pared de los vasos sanguíneos y rodeados por la lámina basal (amarillo) separándolos del endotelio (marrón claro) y los pies astrocíticos (azul). Por último se adjunta una imagen obtenida mediante inmunofluorescencia para GFAP (astrocitos en rojo) y colágeno IV (vasos sanguíneos en verde). El núcleo de cada célula está marcado con DAPI (azul). Adaptado de (Deby, 1979).

Muchas investigaciones se han centrado en las moléculas producidas por los astrocitos como estrategia en el diseño de métodos de neuroprotección en distintas neuropatologías (Abbott et al., 2006, Daneman, 2012, Wong et al., 2013). En concreto, se han publicado datos experimentales indicando que los astrocitos liberan factores solubles que aumentan las propiedades de barrera y el contenido proteico de las uniones estrechas (Chodobski et al., 2011, Luissint et al., 2012, Alvarez et al., 2013).

Además, los astrocitos secretan moléculas antioxidantes beneficiosas, incluyendo el GSH, la superóxido dismutasa (1,2 y 3) y el ascorbato, los cuales son importantes para la supervivencia celular durante procesos neurodegenerativos (Anderson and Swanson, 2000,

Dringen, 2000, Lindenau et al., 2000, Sims et al., 2004, Mythri et al., 2011). Diferentes modelos de murino han mostrado la importancia del GSH en la protección de la BHE, incluyendo el mantenimiento de su permeabilidad y la protección oxidativa de los pericitos (Shukla et al., 1993, Agarwal and Shukla, 1999, Price et al., 2012).

Sin embargo, tras un daño traumático en el SNC se produce una pérdida de sangre y seguidamente la rotura de la BHE. La infiltración de proteínas sanguíneas como trombina (Nishino et al., 1993) y fibrinógeno (Ryu et al., 2009) desencadena una reacción inflamatoria. Al mismo tiempo, las células hematógenas incluyendo leucocitos, macrófagos y linfocitos también invaden desde el sitio de la lesión al tejido neural circundante, secretando diversas citoquinas (Merrill and Benveniste, 1996, Donnelly and Popovich, 2008). Bajo la influencia de estos factores, los astrocitos, microglía y células progenitoras de oligodendrocitos son activados formando una cicatriz glial alrededor de la zona lesionada (Kawano et al., 2012).

Es importante describir la estructura y función de esta importantísima BHE, ya que el paso de fármacos a través de esta resulta crucial para un tratamiento farmacológico con fines terapéuticos en el sistema nervioso. En este trabajo en particular se analizarán los efectos del tratamiento farmacológico con ácido lipoico (LA; lipoic acid), un antioxidante que es capaz de atravesar esta BHE y que resulta crucial tras daño cerebral focal.

4. Lesiones cerebrales

El traumatismo craneoencefálico (TCE) agudo está asociado con una morbilidad y mortalidad considerable. Se estima que en los Estados Unidos surgen 52.000 muertes cada año como resultado de un TCE y aproximadamente 5,3 millones de personas viven con discapacidades relacionadas con el TCE (Selassie et al., 2003). Ocurre de manera similar en la Unión Europea, donde aproximadamente 7,7 millones de personas tienen discapacidades debidas al TCE (Tagliaferri et al., 2006). Respecto a la incidencia concreta en España, no disponemos de fuentes fiables, pero puede estimarse que el número de pacientes hospitalizados anualmente por daño cerebral traumático supera a la suma de los pacientes diagnosticados de esclerosis múltiples, cáncer de mama y daño medular traumático (Prieto et al., 2009). En los países desarrollados, la causa más frecuente de TCE son los accidentes de tráfico (Tagliaferri et al., 2006). Pero, aunque el TCE representa un problema significativo de salud pública en el mundo, no hay en este momento tratamientos que mejoren los resultados clínicos de manera efectiva (Roberts et al., 1998, McKee et al., 2005).

Clínicamente se pueden diferenciar dos grandes grupos de lesiones del parénquima cerebral secundarias a un TCE: lesiones traumáticas focales y lesiones difusas (Gennarelli et al., 1982). Algunos modelos experimentales animales reproducen fundamentalmente lesiones cerebrales focales (Dixon et al., 1988, McIntosh et al., 1989), mientras que otros reproducen un daño cerebral difuso (Marmarou et al., 1994, Cernak et al., 2004).

Las lesiones traumáticas cerebrales de tipo focal pueden ser secundarias tanto a los efectos del impacto como a las fuerzas de inercia, mientras que las lesiones difusas son siempre secundarias a movimientos de aceleración/deceleración de la cabeza (Adams et al., 1983, Adams et al., 1989, Margulies et al., 1990).

Además, las lesiones cerebrales difusas tienden a producir una disfunción global de las funciones corticales y se asocian generalmente a un peor pronóstico neurológico que las lesiones focales. Dentro de los modelos animales utilizados para el estudio de daño cerebral traumático focal se encuentran el modelo de daño criogénico, la caída de un peso sobre el cráneo, el modelo de percusión lateral por fluido y el modelo del impacto cortical controlado (Prieto et al., 2009).

Respecto al daño cerebral traumático, es importante destacar que se pueden diferenciar dos estados, por una parte el daño primario (Faul et al., 2010) en el lado del impacto, que resulta ser severo para las células nerviosas y los vasos sanguíneos con hemorragia y por otra parte un daño secundario, (Thurman et al., 1999) que incluye procesos fisiopatológicos que son iniciados por el daño primario. Este daño secundario se manifiesta en un periodo de entre horas a incluso días y es caracterizado por una amplia degeneración neuronal y glial, la ruptura de la BHE, edema, estrés oxidativo, inflamación y muerte celular (McIntosh et al., 1996, DeKosky et al., 1998, Werner and Engelhard, 2007, Cederberg and Siesjo, 2010, Sauerbeck et al., 2011, Raslan et al., 2012).

Con la ruptura de la BHE, se produce una entrada de células inmunes en el SNC. La acumulación de estas células inmunes procedentes de la sangre a la zona lesionada es paralela a la activación de astrocitos y microglía residente en el SNC, donde finalmente se transforman en macrófagos fagocíticos (Koshinaga et al., 2000). Estos expresan citoquinas, siendo por lo tanto los principales mediadores inflamatorios (Hauwel et al., 2005). La reacción inflamatoria es reconocida como una característica de las enfermedades neurodegenerativas agudas y crónicas y aunque parece ser que en un periodo inicial esta inflamación es activada como una reacción inicial del tejido cerebral para limitar el daño tisular asociado al daño cerebral, cuando se prolonga en el tiempo puede contribuir al desarrollo de un daño secundario extenso (Marchetti and Abbracchio, 2005).

Por lo tanto, estos procesos patológicos secundarios que se producen en un periodo de entre horas a días se constituyen en gran objetivo para el tratamiento y el diagnóstico del daño cerebral traumático (Touzani et al., 2001, Smith et al., 2012); siendo el área potencialmente salvable, el área de penumbra, que se refiere al área del cerebro que ha sido dañada pero aún no se ha producido muerte neuronal. De modo que si se encontrase un terapia adecuada, esta sería principalmente la zona a rescatar (Adams et al., 1989, Chesnut, 1995, Jeremitsky et al., 2003, Plesnila et al., 2003, Unterberg et al., 2004).

Remarquemos de lo mencionado anteriormente, que una de las respuestas al daño del SNC culmina con la formación de una barrera, la cicatriz glial, formada principalmente por astrocitos reactivos (Rocamonde et al., 2012). Esta gliosis reactiva puede tener un papel importante en evitar la extensión del daño en los primeros estadios de éste, pero es un obstáculo a la recuperación en los estadios más tardíos o en situaciones crónicas (Buffo et al., 2010, Rocamonde et al., 2013, Paradells et al., 2015). A lo largo de este trabajo, se analizará la importancia de evitar estos procesos de gliosis con el objetivo de conseguir una correcta reparación del tejido neural.

Sin embargo, a pesar de los avances que se han realizado en comprender la fisiopatología del daño traumático, actualmente no hay una estrategia de reconstrucción clínicamente efectiva, exceptuando la evacuación quirúrgica de hematomas intracraneales con efecto de masa y un control estricto de la presión arterial y la presión intracraneal del paciente (Morales et al., 2005). Por lo tanto, la recuperación de este daño sigue siendo un gran problema y su impacto socioeconómico es enorme (Vannucci and Perlman, 1997, Davenport and Dennis, 2000, Harting et al., 2008).

4.1. Estudio de lesión cerebral focal mediante un modelo de criolesión

El modelo de criolesión, también llamado lesión fría o daño criogénico, consiste en la aplicación de un fluido frío (James and Schneider, 1990) o de una barra metálica enfriada con nitrógeno líquido (Todd et al., 1993) sobre la superficie expuesta del cerebro y fue descrito por primera vez en 1958 por Klatzo (Klatzo et al., 1958). Este modelo es considerado intermedio dentro de la jerarquía de los modelos de lesiones cerebrales (Klementiev et al., 2008), entre el modelo de craneotomía (Prins and Hovda, 2003, Williams et al., 2005) y el modelo de traumatismo craneal menor (Zohar et al., 2003, Henninger et al., 2005). El modelo de daño criogénico induce una lesión cortical por enfriamiento local del cerebro consistente en un foco necrótico rodeado de vasos con una permeabilidad aumentada por la rotura de la BHE (Reulen et al., 1978). Debido a este daño temprano de la BHE, el daño cortical criogénico conlleva un edema vasogénico, hinchazón cerebral e inflamación (Cederberg and Siesjo, 2010, Sauerbeck et al., 2011). Muchos estudios señalan que las características histológicas y patológicas de las lesiones criogénicas comparten muchas de las características distintivas del daño traumático cerebral en humanos. Pues como hemos mencionado, se produce una sobrerregulación en la expresión de citoquinas inflamatorias, y también se observan cambios con el tiempo como son la atrofia cerebral, el deterioro cognitivo y anormalidades en el comportamiento (Siren et al., 2006, Sargin et al., 2009).

Además, las lesiones causadas por este modelo de criolesión son altamente reproducibles en tamaño y localización (Albert-Weissenberger and Siren, 2010), destacando su simplicidad técnica y no se requiere craneotomía, sino que requiere de una cirugía mínimamente invasiva y mantiene el estado de asepsia, pero produce cambios severos en la morfología del cerebro y alteraciones motoras y cognitivas (Jones et al., 2005, Penkowa et al., 2006).

Asimismo, permite el estudio de la angiogénesis y de los procesos de reparación en la corteza cerebral en un ambiente que no se ve afectado por la isquemia y por tanto, estos descubrimientos pueden ser relevantes para las lesiones traumáticas en la corteza cerebral humana (Nag, 1996, Raslan et al., 2012).

Un conocimiento más exhaustivo de las diversas alteraciones fisiopatológicas producidas en el daño cerebral traumático, especialmente a nivel celular y molecular, es un requerimiento básico previo a la búsqueda de cualquier terapia capaz de interferir específicamente con los mecanismos subyacentes a las lesiones cerebrales traumáticas (Prieto et al., 2009).

5. Estrés oxidativo tras lesión cerebral focal

5.1. Los radicales libres

La vida aerobia conlleva una formación constante de pro-oxidantes balanceada por la desaparición de los mismos debida a los antioxidantes (Circu and Aw, 2010). Cuando se produce una situación de desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros se denomina estrés oxidativo (Sies, 1991, Kaur and Ling, 2008). Por lo tanto, el estrés oxidativo es causado por un desequilibrio en el estado redox de la célula, que puede ser debido tanto a una sobreproducción de ERO, como a una disfunción en el sistema antioxidante endógeno (Tomassoni et al., 2013). Se denominan ERO o radicales libres a todas aquellas moléculas que contienen en su orbital más externo un electrón desapareado, por tanto, el electrón de dicho orbital necesitaría de otro para poseer una configuración bioquímica y electromagnética estable. Por ello, los radicales libres tienden a reaccionar con otras moléculas cercanas para completar este orbital, desestabilizando con ello la configuración electrónica de las moléculas con las que reaccionan, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas, pudiendo producir reacciones en cadena que guían finalmente a la muerte celular (Hall et al., 1993, Lancelot et al., 1995, Kil et al., 1996, Circu and Aw, 2010). Las ERO se forman por la reducción secuencial del oxígeno produciendo las especies reactivas superóxido, hidroxilo y peróxido de hidrógeno, o del óxido nítrico a peroxinitrilo (Retel et al., 1993). Algunas de estas reacciones dependen también de la presencia de metales de transición como el hierro y el cobre (Vilar-Rojas et al., 1996). Las ERO pueden ser generadas por diversas fuentes endógenas celulares como la cadena electrónica mitocondrial (Kas and Blattna, 1986, Nacmias et al., 2004, Gandhi and Abramov, 2012), la excesiva actividad de la NADPH fagocitaria (Gabig and Babior, 1979, Zhang et al., 2012), la activación del metabolismo del ácido araquidónico en procesos inflamatorios (Winyard et al., 1994), la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (Beckman et al., 1990, Ninkovic et al., 2009) y/o la menor capacidad de los mecanismos protectores antioxidantes (Giugliano et al., 1996, Gandhi and Abramov, 2012); pero también por fuentes exógenas, como las radiaciones ionizantes (Fridovich, 1983, Datta et al., 2012), el aumento en la disponibilidad de metales de transición en algunas enfermedades metabólicas y en procesos inflamatorios (Halliwell and Gutteridge, 1986), la acción de xenobióticos y algunos fármacos (Trush et al., 1982) y el exceso en la concentración de oxígeno o los procesos en los que hay fenómenos de isquemia –reperfusión (McCord and Roy, 1982, Gandhi and Abramov, 2012).

Así, cuando estos radicales libres están en exceso pueden actuar en las membranas celulares, produciendo una modificación oxidativa de los lípidos que se denomina peroxidación lipídica, pero también pueden actuar con los ácidos nucleicos y proteínas, ocasionando un daño oxidativo irreversible, que induce a la aparición de mutaciones y alteraciones de las funciones vitales de la célula que puede producir enfermedad o conducir a la muerte (Durand and Mach, 2013, Cregut et al., 2014). El principal marcador de la peroxidación lipídica es el malondialdehído (MDA), un compuesto de tres carbonos que procede de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, principalmente el ácido araquidónico. Varios estudios

demuestran que los niveles de MDA están incrementados en varias enfermedades caracterizadas por un exceso de radicales libres de oxígeno (Ohkawa et al., 1979, Guichardant et al., 1994, McAllister, 2011, Bains and Hall, 2012, Ozbal et al., 2015).

5.2. Papel fisiológico y fisiopatológico de los radicales libres

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

En cuanto a su papel fisiopatológico, la producción de radicales libres se ha relacionado con hipertensión (Zalba et al., 2001, Droge, 2002, Touyz, 2004), disfunción cardiovascular (Ramachandran et al., 2003), inflamación (Telfer and Brock, 2004), diabetes (Hermenegildo et al., 1993, Miranda et al., 2004, Muriach et al., 2006, Johnsen-Soriano et al., 2007, Arnal et al., 2010), síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (Jareno et al., 2002), aterosclerosis (Madamanchi et al., 2005, Mueller et al., 2005), retinosis pigmentaria (Carmody et al., 1999, Hackam et al., 2004), lesiones cerebrales (Olesen, 1987, Liu et al., 2011b), etc.

5.3. Modelos de estrés oxidativo en estudios de daño neural

El tejido cerebral es altamente susceptible al daño oxidativo comparado con otros tejidos (Halliwell, 2006). Esta vulnerabilidad del cerebro al daño oxidativo es debido probablemente a los fosfolípidos de membrana ricos en ácidos grasos poliinsaturados, que son una fuente para la peroxidación, a un elevado consumo de oxígeno y a una baja cantidad de enzimas antioxidantes.

Se ha demostrado la generación de radicales libres tras un daño cerebral (Hall et al., 1993, Lancelot et al., 1995, Kil et al., 1996). En concreto, el estrés oxidativo está en la cima de los mecanismos responsables del daño secundario en neurotraumas. Una de las consecuencias del estrés oxidativo post-traumático es la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de membrana, los cuales pueden afectar a la función de la BHE, pero es también importante remarcar que las ERO pueden jugar un papel importante en promover la neuroinflamación post-traumática.

Evidencias experimentales usando modelos animales y celulares han demostrado la existencia de diferentes moléculas que pueden inducir el estrés oxidativo y por consiguiente un daño celular (Chodobski et al., 2011). Por tanto, primeramente en nuestro estudio vamos a utilizar tres de estas moléculas capaces de simular el estrés y daño celular producido tras un daño cerebral traumático. Entre otras podemos destacar el L-Butionina-S,R-sulfoximina (BSO), que utilizaremos como estresor.

El BSO es un inhibidor de la síntesis del antioxidante más abundante en el cerebro, el GSH, pues inhibe de manera específica e irreversible la enzima gamma-glutamil cisteína (γ -CGL), encargada de su síntesis (Figura 10) (Griffith, 1982, Yamada et al., 2011).

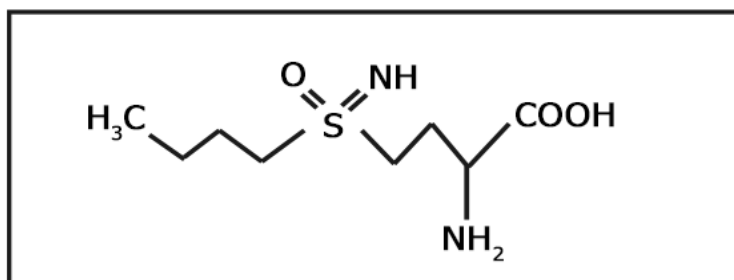


Fig.10. Estructura química del BSO. Adaptado de (Watanabe et al., 2003).

Una reducción en el GSH celular tiene la capacidad de incrementar la concentración de peróxidos en la célula, por lo tanto causando un estrés oxidativo en la célula. Además, se ha visto que la disminución de GSH induce apoptosis en determinados sistemas celulares (Fernandes and Cotter, 1994, Jenner and Olanow, 1996). En concordancia con estos resultados, se ha confirmado en otros estudios que se produce una disminución de la muerte celular cuando el contenido de GSH se incrementa en otras partes del SNC como la retina (Miranda et al., 2010).

Otras moléculas que producen neuropatologías como el Alzheimer o el Parkinson son el péptido-beta-amiloide ($A\beta$), la dopamina y algunas citoquinas proinflamatorias. Estas moléculas patológicas inducen directamente muerte de las células neuronales a través del estrés oxidativo o estimulando indirectamente a las células gliales, como las células de microglía, a producir moléculas inflamatorias neurotóxicas como ERO, especies reactivas de nitrógeno, $TNF\alpha$ e IL-1; todo ello como mecanismo de daño cerebral (Saito et al., 2005).

Pero como causa de inducción de la muerte neuronal, además de la dopamina se pueden emplear otros estímulos como el lipopolisacárido (LPS). Diversos estudios demuestran que la dopamina puede inducir específicamente apoptosis de células neuronales derivadas del SNC y que contienen catecolaminas (Suri et al., 1993) por generar metabolitos tóxicos como la quinona dopamina o semiquinona de dopamina (Choi et al., 2003, Izumi et al., 2005). Por otra parte, el LPS es capaz de actuar como un estimulador de células de microglía produciendo mediadores inflamatorios tóxicos como el NO y el $TNF\alpha$.

En concreto, la dopamina, que también utilizaremos en este estudio como estresor, es el más abundante neurotransmisor en el ganglio basal (Hornykiewicz, 1966). Es sintetizada en las neuronas de gran diámetro de la sustancia negra y es liberada de los terminales que residen dentro del núcleo caudado y putamen (en roedores es llamado estriado) (Figura 11) (Carpenter, 1976).

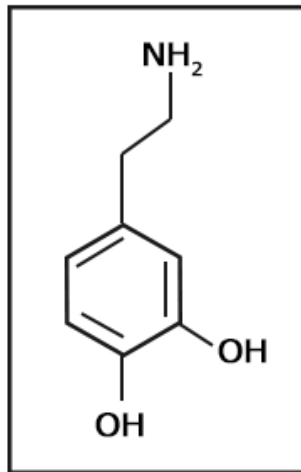


Fig.11. Estructura química de la dopamina. Adaptado de (Munoz et al., 2012).

Cuando la dopamina es producida en exceso y no puede ser transportada dentro de la célula, permanece libre pudiendo ser oxidada a dopamina quinona o formar superóxidos y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Graham, 1978, Hastings et al., 1996, Stokes et al., 1999) que pueden dañar a la célula y las membranas de las organelas llevando a una disfunción celular (Hastings et al., 1996, Rabinovic and Hastings, 1998, Asanuma et al., 2003). La dopamina puede también autooxidarse para formar radicales hidroxilos (OH) (Hastings and Zigmond, 1994, Hastings et al., 1996, Stokes et al., 1999) o tras la oxidación del H_2O_2 , puede reaccionar con hierro, cobre u oxígeno para formar dichos radicales (Mounsey and Teismann, 2012).

Por otra parte, el LPS que también utilizaremos en este estudio como estresor (Figura 12), es el principal componente estructural y funcional de la pared de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y es el responsable del inicio del *shock* endotóxico inducido por éstas.

Ha sido usado como un modelo clásico para activar las células inmunocompetentes y desencadenar una respuesta inflamatoria sistémica y central. En modelos de neuroinflamación inducida por el LPS, la activación de la microglía ha estado asociada con el daño neuronal constante y la disfunción cognitiva (Ruiter et al., 1981, Laskin and Pendino, 1995, Ayala and Chaudry, 1996, Cunningham, 2013). Las células de microglía, evalúan y mantienen la homeostasis del cerebro (Hanisch and Kettenmann, 2007). Sin embargo, en respuesta al LPS, estas células microgliales secretan citoquinas proinflamatorias como el $TNF\alpha$, interleuquina-6 (IL-6), IL- 1β o IL-12 (Kozlov et al., 1999) y ERO (Victor et al., 2000). Está bien documentado que las citoquinas proinflamatorias y las ERO contribuyen al desarrollo del *shock* séptico, fallo multiorgánico y muerte (Goraca and Aslanowicz-Antkowiak, 2009).

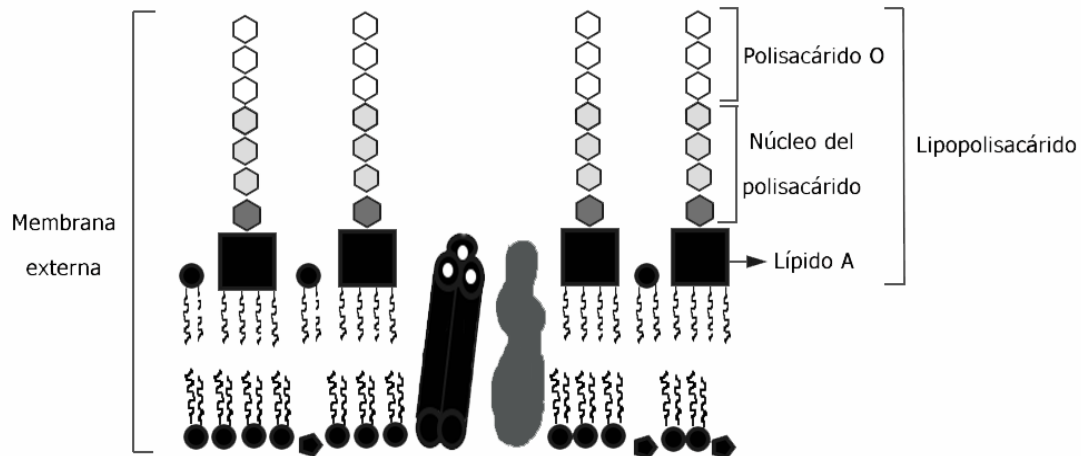


Fig.12. Estructura de la capa externa de bacterias Gram-negativas. Presentan mayoritariamente lipopolisacáridos que constan de varias partes, lípido A, núcleo y el antígeno O. Adaptado de (Michael T. Madigan, 2003)

Pero además, hay evidencias experimentales que han mostrado que toxinas biológicas y medioambientales, como la α -sinucleína, el LPS, herbicidas y pesticidas como rotenona o MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), pueden inducir no solo microgliosis, sino también astrogliosis, produciendo una alteración de la morfología neuronal estriatal, muerte neuronal, disfunción mitocondrial y fragmentación nuclear (Langston et al., 1999, Samantaray et al., 2007, Niranjana et al., 2010). En relación con estos estudios, experimentos llevados a cabo en cerebros de rata han puesto de manifiesto que inyecciones de LPS en estos cerebros, conllevan un incremento en el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS; inducible nitric oxide synthase), sugiriendo que la activación glial crónica puede causar estrés oxidativo en el cerebro, de forma similar a lo que ocurre en procesos neurodegenerativos como la enfermedad del Alzheimer y el Parkinson (Sugaya et al., 1998, Hirsch et al., 2003, de Oliveira et al., 2011).

Por lo tanto, los astrocitos reactivos pueden jugar también un papel crítico en sostener esta respuesta inflamatoria sistémica tras la inyección del LPS, junto con otros tipos celulares neuroinmunes. El mecanismo por el cual se produce esta disfunción del SNC de manera prolongada, involucra la liberación de citoquinas proinflamatorias y la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B; nuclear factor- κ B) en los astrocitos (Fu et al., 2014). Siendo NF- κ B un regulador de la inflamación, pues su activación y translocación nuclear es crucial en la modulación de las citoquinas proinflamatorias y la neuroinflamación (Karin and Lin, 2002).

Así, aunque la microglía ha sido clásicamente clasificada como especie celular inmunocompetente en el SNC y asociada con la neuroinflamación en varias condiciones neurológicas (Kreutzberg, 1996), los astrocitos también juegan un papel fundamental en esta inflamación (Lee et al., 1998, Cardinaux et al., 2000).

Con todos estos conocimientos y sabiendo que si combinamos el efecto de la dopamina y la activación microglial, se incrementa el daño celular (Lee et al., 2007), en nuestro estudio, decidimos evaluar el posible daño producido tras un trauma cerebral mediante el uso de estresores como la dopamina, el LPS y el BSO, para posteriormente, evaluar la recuperación del daño celular *in vitro*.

Pero valorando también, el efecto de la aplicación del LA en una situación de daño oxidativo *ex vivo*, mediante la inducción de peroxidación lipídica a partir de sales de hierro Fe (II) y ácido ascórbico (Ohkawa et al., 1979, Fraga and Tappel, 1988, Battioni et al., 1991, Oboh et al., 2014). Pues se ha descrito que algunos metales tales como el hierro, cobre, cobalto y manganeso, pueden promover la peroxidación lipídica, siendo el hierro y el cobre los que participan en la producción de los derivados oxigénicos más agresivos, ocasionando como resultado un daño a las bases de ADN. En lo referente al mecanismo de acción de los metales en el desarrollo de la peroxidación lipídica, el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) puede reducir los iones metálicos que convierten el H_2O_2 en un radical hidroxilo ($HO\cdot$) que es un oxidante extremadamente activo y puede extraer hidrógeno de los ácidos grasos insaturados mediante la clásica reacción de Fenton (Minotti and Aust, 1987, Halliwell et al., 1995). Los metales de transición pueden también estimular la peroxidación lipídica al catalizar la descomposición de los hidroperóxidos formados (ROOH) para formar radicales alcoxi (RO \cdot) y peroxi (ROO \cdot), que pueden iniciar además amplias reacciones en cadena (Hsieh and Kinsella, 1989). En algunas circunstancias estos procesos precisan la presencia de agentes reductores como el ácido ascórbico. Este último, aunque puede actuar como antioxidante a altas concentraciones, en pequeña cantidad podría tener actividad prooxidante. Este comportamiento se debe a que a baja concentración actúa manteniendo una parte del hierro en estado ferroso (mayor actividad prooxidante) a través de la reacción de Fenton (Buettner, 1991).

5.4. Defensa antioxidante tras daño neural

Las células de los mamíferos han desarrollado una variedad de enzimas para detoxificar las ERO producidas durante el normal metabolismo en distintos procesos fisiopatológicos (Freeman and Crapo, 1982, Kehrer, 1993). Entre estos componentes celulares, el GSH, la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GSSG-R) reciben una especial atención. La GPx cataliza la descomposición de H_2O_2 en agua. En la reacción catalizada por la GPx, el GSH es oxidado a GSSG, el cual puede ser reducido a GSH por la acción de la enzima GSSG-R (Fang et al., 2002, Lei, 2002).

El GSH es un tripéptido ubicuo de glicina, glutamato y cisteína. Como hemos comentado anteriormente, es el antioxidante más abundante en el cerebro, y su principal función es proteger el tejido contra los efectos causados por el daño oxidativo, haciendo un barrido de radicales libres procedentes de agentes tanto endógenos como exógenos (Reed, 1986, Lu, 1999, Mytilineou et al., 2002).

En el cerebro, los niveles de GSH se encuentran en bajas concentraciones (1-3 mM), como mecanismo autoprotector, debido a que las moléculas precursoras de GSH como el glutamato pueden ser tóxicas a altas concentraciones (Calabrese et al., 1997, Schubert and Piasecki, 2001, Wang and Cynader, 2001, Kokovay et al., 2006). Sin embargo, numerosos estudios han demostrado niveles disminuidos de GSH en condiciones patológicas incluyendo la isquemia cerebral y las neurodegeneraciones (Toklu et al., 2009, Yamada et al., 2011, Dalazen et al., 2014).

La síntesis de GSH se da en neuronas y células gliales, aunque los astrocitos sintetizan GSH de manera más efectiva que las neuronas por su capacidad de utilizar una amplia variedad de sustratos precursores (Dringen and Hirrlinger, 2003).

Las características antioxidantes del GSH han sido demostradas en numerosos modelos de estrés oxidativo, incluyendo la reducción del GSH con el BSO (Andersen et al., 1996, Wullner et al., 1996, Ibi et al., 1999, Canals et al., 2001, Chinta and Andersen, 2006), ácido etacrínico (Muyderman et al., 2004), o la reducción de la síntesis de GSH usando la ligasa glutamilsteína (GCL) (Jha et al., 2000, Chinta et al., 2006) o glutaredoxina 2 (Lee et al., 2009). En estos estudios, bajos niveles de GSH incrementan el estrés oxidativo en todas las células así como en las fracciones mitocondriales e incrementan la peroxidación lipídica, el calcio intracelular y la actividad de la gamma-glutamil transpeptidasa (γ GT).

Como la capacidad del sistema antioxidante endógeno del cerebro es limitada, sería de gran interés estudiar el uso de antioxidantes que pudiesen atravesar la BHE (Nicotra et al., 2005) y proteger al tejido neural de ser dañado por un incremento de las ERO (Goraca and Aslanowicz-Antkowiak, 2009). En este sentido, hablaremos más adelante de la acción del antioxidante LA que utilizaremos en nuestro estudio.

Pues se ha demostrado que el LA puede disolverse tanto en agua como en lípidos y atravesar la BHE (Nicotra et al., 2005) actuando como antioxidante (Rocamonde et al., 2012, Ji et al., 2013). En concreto, se ha descrito como el LA está involucrado en el reciclaje de algunos antioxidantes como la vitamina C, la vitamina E o el GSH (Moini et al., 2002, Golbidi et al., 2011). Además, el LA puede incrementar indirectamente los niveles de GSH al aumentar la captación de cisteína, paso limitante en la biosíntesis de GSH (Ruiter et al., 1981).

6. Capacidad regenerativa del sistema nervioso

6.1. Neurogénesis en el sistema nervioso central durante estadios adultos

El descubrimiento de la neurogénesis en el cerebro adulto (el proceso por el cual se generan nuevas neuronas) se enfrentó a la persistente suposición de que las neuronas adultas no llevaban a cabo un proceso de proliferación. En el 1960, las primeras observaciones de Altman aportando la existencia de neurogénesis adulta (Altman, 1962), y los posteriores estudios de Kaplan y Hinds (Kaplan and Hinds, 1977) provocaron reacciones negativas y publicaciones críticas que no confirmaban la existencia de nuevas neuronas en el adulto (Rakic, 1985). Sin embargo, sobre el mismo periodo se publicaron datos de neurogénesis en pájaros, un descubrimiento que dio lugar a nuevos pensamientos sobre la plasticidad cerebral y la adaptación (Goldman and Nottebohm, 1983, Paton and Nottebohm, 1984, Nottebohm, 1989).

Pero no fue hasta 30 años más tarde, la década de los 90, cuando la neurogénesis volvió a ser tema científico de interés, aceptado y en auge. A esto contribuyó la publicación de numerosos trabajos. Pero, ante esta realidad, se impuso la necesidad de comprender cómo se desencadena o se inhibe la neurogénesis y cómo se regula.

La neurogénesis en los mamíferos adultos se produce en las regiones neurogénicas del cerebro adulto que son principalmente, la zona subgranular (SGZ; subgranular zone) del hipocampo, la zona subventricular (SVZ; subventricular zone) y el bulbo olfatorio (OB; olfactory bulb) (Zhao et al., 2008, Hagg, 2009), a partir de células madre neurales. Estas células madre están limitadas a la generación de un solo tipo de neuronas, las granulares del giro dentado, o varios tipos de neuronas (neuronas granulares y periglomerulares en la SVZ) (Zhao et al., 2008, Ming and Song, 2011).

Vamos a describir con mayor detalle la SVZ, ya que en nuestros experimentos utilizaremos un modelo experimental de daño cerebral por criolesión en la proximidad del ventrículo lateral.

La SVZ es una región neurogénica en el ventrículo lateral donde nuevas neuronas son continuamente generadas a lo largo de la vida de los mamíferos adultos (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). Estas nuevas células generadas migran tangencialmente a través de la corriente migratoria rostral (CMR) hasta el OB, donde se diferencian en diferentes tipos de interneuronas locales (Figura 13) (Lois and Alvarez-Buylla, 1994). Muchas de estas nuevas células generadas (75-99%) se diferencian en células granulares GABA (GCs) y forman sinapsis con las células mitrales que son neuronas de proyección en el OB, mientras que un pequeño número (1-25%) se diferencian en células periglomerulares expresando GABA o tirosina hidroxilasa (Luskin, 1998, Roy et al., 2000, Kato et al., 2001, Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002, Winner et al., 2002, Belluzzi et al., 2003, Carleton et al., 2003) y forman sinapsis tanto con las neuronas sensoriales como con las células mitrales.

El nicho neurogénico de la SVZ contiene al menos cuatro diferentes tipos celulares definidos por su morfología, ultraestructura y marcadores moleculares (Figura 13) (Doetsch et al., 1997).

El epéndimo constituye una capa de células cúbicas multiciliadas que separan la SVZ del fluido cerebroespinal. Además, las células tipo B, de naturaleza astrogliar, son consideradas las células madre neurales adultas (aCMN) en mamíferos (Doetsch et al., 1999). Estas células proliferan lentamente, son capaces de autorenovarse y generar precursores de rápida proliferación o células tipo C. Después de varias divisiones, las células tipo C generan un aumento de células tipo A, neuronas inmaduras que migran tangencialmente formando una cadena de células rodeadas por una cubierta de astrocitos. Por lo tanto, se ha propuesto la progresión ascendente B-C-A (Doetsch et al., 1997, Doetsch et al., 1999). Microglía, células picnóticas y neuronas son poblaciones menores en la SVZ.

Es interesante destacar, que las células tipo B de la SVZ extienden terminaciones apicales en contacto con el ventrículo y terminaciones basales hacia los vasos sanguíneos (Mirzadeh et al., 2008, Shen et al., 2008). Estos contactos son importantes porque se ha sugerido que la matriz extracelular (MEC) (Mercier et al., 2002) o los factores solubles (Leventhal et al., 1999, Shen et al., 2008, Tavazoie et al., 2008) secretados por los vasos sanguíneos tienen un papel muy importante en la regulación de la neurogénesis.

De forma paralela, los progenitores neurales de la SVZ también generan células precursoras de oligodendrocitos que migran de forma radial a los tramos cercanos de la materia blanca del cuerpo calloso, *septum* y *fimbria-fórnix* y se diferencian en oligodendrocitos

mielinizantes (Nait-Oumesmar et al., 1999, Picard-Riera et al., 2002, Jackson et al., 2006, Menn et al., 2006, Gonzalez-Perez et al., 2009).

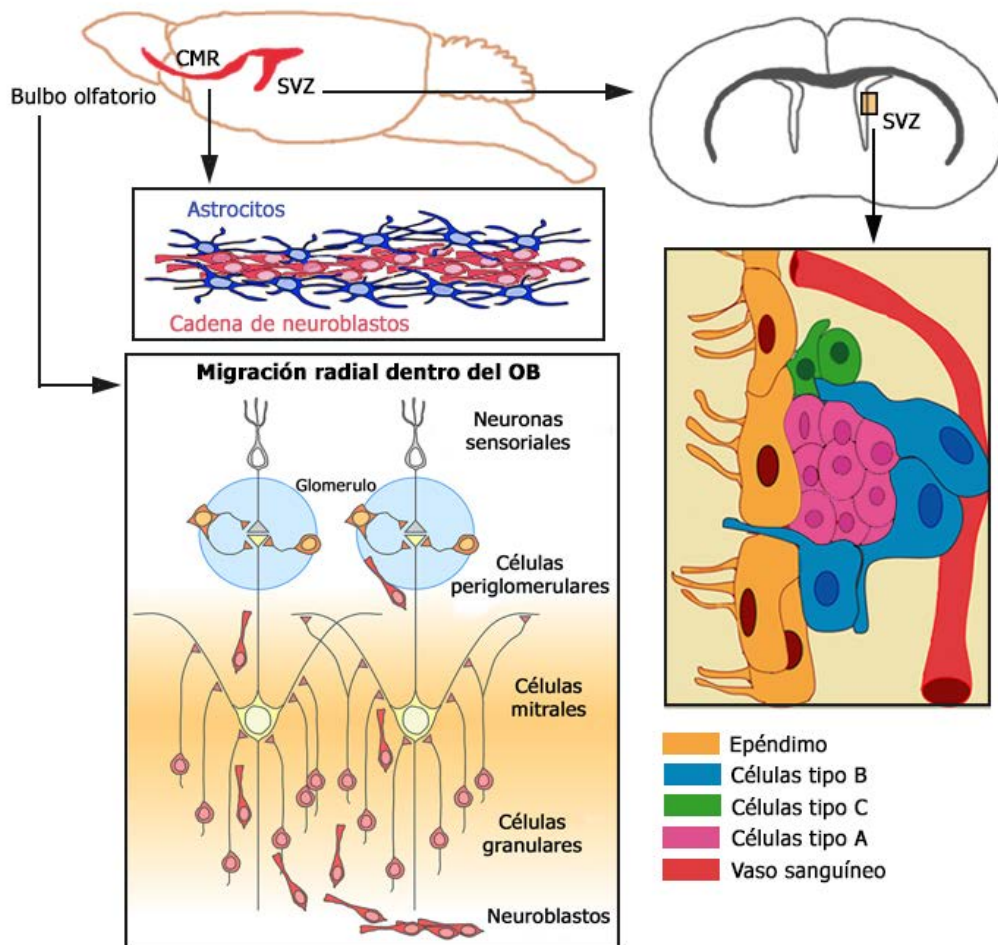


Fig. 13. Neurogénesis en la SVZ del cerebro adulto. Se presenta un dibujo esquemático que representa una vista sagital de la SVZ y la CMR. Además se presenta un dibujo esquemático que describe la organización de los cuatro tipos celulares distintos que se encuentran en la SVZ: el epéndimo (naranja), los astrocitos (azul), las células de rápida proliferación (verde) y los neuroblastos (rosa). Por otra parte, se observa como los neuroblastos generados (rosa) en la SVZ migran hacia el OB a través de la CMR formando unas cadenas de neuroblastos agregados rodeados por astrocitos. Tras la llegada al OB, la cadena de neuroblastos se disocia en células individuales y migran de forma radial dentro del OB. Adaptado de (Gonzalez-Perez et al., 2012) y (Sawada and Sawamoto, 2013).

Es importante señalar que las células de microglía que encontramos en la pared ventricular están en íntimo contacto con las células tipo B. Esto sugiere una interacción local entre las células inmunes y las aCMN. Como hemos comentado anteriormente, en el SNC, la microglía es el principal efector de inmunidad en el cerebro y fuente de numerosas citoquinas, entre ellas, el factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1, Insulin Growth factor-1) y TNF α (von Zahn et al., 1997, Ben-Hur et al., 2003, Schwamborn et al., 2003, Widera et al., 2004, Wong et al., 2004, Song et al., 2005, Bauer and Patterson, 2006, Butovsky et al., 2006, Covey and Levison, 2007, Oshima et al., 2007, Choi et al., 2008, Johansson et al., 2008, Whitney et al., 2009). La microglía puede incrementar la neurogénesis al producir IGF-1, que activa la vía de

la quinasa reguladora de la señal extracelular (ERK)/proteína quinasa, activada por mitógenos (Choi et al., 2008). Parece que el TNF α también puede tener tanto un efecto negativo como positivo sobre la neurogénesis dependiendo del subtipo de receptor que sea activado. Cuando el TNF α se une al receptor TNFR1 la neurogénesis es inhibida y cuando se une al receptor TNFR2 tanto la proliferación como la supervivencia de las CMN son mejoradas (Iosif et al., 2006, Gomez-Nicola et al., 2011).

6.2. Angiogénesis en el sistema nervioso central durante estadios adultos

Para el desarrollo de cualquier tejido, sano o patológico, es absolutamente necesario que haya un aporte sanguíneo continuo a través de la amplia red vascular, que nutra a las células, de elementos básicos como glucosa, oxígeno y otras moléculas necesarias para el desarrollo de sus funciones metabólicas. La formación de estos vasos se da de dos maneras diferentes: la vasculogénesis y la angiogénesis. La vasculogénesis se produce en la fase embrionaria, a partir de las primeras células mesenquimales progenitoras (angioblastos), que se diferencian en células endoteliales encargadas de formar los primeros vasos sanguíneos. En el proceso de angiogénesis se forman nuevos capilares a partir de los ya existentes, por una proliferación y migración al espacio extravascular de células endoteliales. A diferencia de la vasculogénesis, la formación de nuevos vasos a partir de los ya existentes se da tanto en la fase embrionaria como durante el desarrollo y en la vida adulta (Risau and Flamme, 1995, Pepper, 1997, Marti and Risau, 1999). En concreto, como se ha mencionado anteriormente, la unidad neurovascular del SNC está formada por complejos multicelulares que consisten en células endoteliales, pericitos, neuronas y células gliales, así como factores de crecimiento y proteínas de la MEC que están en proximidad física con el endotelio (Lok et al., 2007, Guo and Lo, 2009).

Sobre la angiogénesis se reconocen dos variantes de la misma: una beneficiosa, en procesos de cicatrización de heridas, ovulación, remodelación del esqueleto o tisular, en úlceras crónicas, en la isquemia miocárdica, etc (Marti and Risau, 1999, Henry et al., 2003); y otra perjudicial, en el crecimiento tumoral, la artritis reumatoide o la retinopatía diabética, situaciones en las que la angiogénesis permite el desarrollo de la enfermedad.

Se ha sugerido que tras un daño cerebral, la finalidad de la aparición de angiogénesis es la de revascularizar una zona dañada, algo necesario para la supervivencia y el desarrollo de nuevas neuronas (Slevin et al., 2006, Lizasoain I, 2007). Dándose al mismo tiempo la infiltración de macrófagos para la eliminación de tejido necrótico, la formación de nuevos vasos y la regeneración del tejido. Este efecto es principalmente beneficioso en la zona de penumbra (Rosell-Novel and Montaner, 2004). Pues, aunque algunos autores proponen que cuanto menor sea la respuesta inflamatoria mayor será la capacidad de regeneración (Mescher and Neff, 2006, Bonfanti, 2011), las citoquinas inflamatorias también producen un bucle de realimentación que puede traer no solo consecuencias perjudiciales, sino también consecuencias positivas para la neurogénesis (Ekdahl et al., 2003, Monje et al., 2003, Das and Basu, 2008, Miller et al., 2008, Whitney et al., 2009, McPherson et al., 2011).

Algunos de los factores proangiogénicos que se han descrito son citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF α), NO y factores de crecimiento como el TGF β , el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF; platelet derived growth factor), el VEGF, el TGF β o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF; fibroblast growth factor), que son también expresados tras un proceso isquémico (Rosell-Novel and Montaner, 2004, Slevin et al., 2006, Lizasoain I, 2007, Turu et al., 2008). Pero para el proceso de angiogénesis, la sobreexpresión de promotores no es suficiente, ya que también es imprescindible que haya una regulación de las moléculas inhibitoras. Por ello, hay que valorar la angiogénesis como un proceso activo; con expresión de promotores e inhibidores que varían espacial y temporalmente (Rosell-Novel and Montaner, 2004).

Como resultado diremos que puede ser de gran ayuda promover la angiogénesis, ya que está directamente relacionada con la neurogénesis. Esta última necesita de nueva vasculatura para sobrevivir durante más tiempo. Además, los vasos sanguíneos tienen un papel muy importante como andamio para la migración de las células progenitoras neurales hacia la región dañada del cerebro (Kojima et al., 2010).

6.3. Neurogénesis y angiogénesis tras daño en el sistema nervioso central

Una significativa autorecuperación ocurre tras los episodios de daño cerebral traumático (Anderson et al., 2000, Demeurisse, 2000, Ewing-Cobbs et al., 2003). El mecanismo todavía no está claro, pero se ha visto que la neurogénesis inducida por el daño, es uno de los mecanismos convincentes que contribuyen a la recuperación (Eriksson et al., 1998, Chirumamilla et al., 2002, Chen et al., 2003d, Richardson et al., 2007).

Tras un accidente cerebrovascular, los neuroblastos generados en la SVZ migran a la zona de límite isquémico donde ocurre la angiogénesis y durante esta migración los neuroblastos quedan estrechamente asociados con los vasos cerebrales (Ohab et al., 2006, Thored et al., 2007). Con la migración, los neuroblastos derivados de la SVZ se diferencian en neuronas maduras en la zona de límite isquémico (Zhang et al., 2004, Yamashita et al., 2006, Katakowski et al., 2007, Zhang et al., 2007a).

Por lo tanto, siguiendo un daño cerebral traumático, se observa que las células procedentes de la SVZ pueden diferenciarse en neuronas y glia en las aéreas dañadas (Kernie et al., 2001, Arvidsson et al., 2002, Nakatomi et al., 2002). Este daño cerebral también estimula la neurogénesis en el SGZ del hipocampo (Kernie et al., 2001, Zhang et al., 2001, Lu et al., 2005, Urrea et al., 2007, Kadam et al., 2008, Xiong et al., 2008).

Así pues, tanto la angiogénesis como la neurogénesis pueden jugar un papel importante en mediar una recuperación funcional tras un daño cerebral traumático (Chen et al., 2003c, Lu et al., 2005, Chopp et al., 2007, Chopp et al., 2008, Wu et al., 2008, Xiong et al., 2008, Li and Chopp, 2009, Zhang and Chopp, 2009, Rocamonde et al., 2012, Paradells et al., 2015).

Clínicamente, se relaciona la angiogénesis y neurogénesis observadas en el cerebro de pacientes que sobrevivieron desde días a semanas tras un derrame cerebral, demostrándose una correlación positiva entre la densidad de los microvasos y la supervivencia

de los pacientes (Krupinski et al., 1994). Además, un incremento de la síntesis de factores de crecimiento angiogénicos como el TGF, FGF, PDGF, VEGF y sus receptores, han sido vistos en el cerebro tras un derrame cerebral (Krupinski et al., 1994, Krupinski et al., 1996, Krupinski et al., 1997). Respecto al conocimiento de los diversos factores con actividad neurotrófica, cabe destacar el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; brain derived neurotrophic factor) involucrado en la regulación de la supervivencia y diferenciación de células nerviosas durante el desarrollo y mantenimiento funcional de las neuronas adultas (Chao, 2000, Huang and Reichardt, 2001).

En concreto, el BDNF pertenece a la familia de las neurotrofinas también llamadas factores neurotróficos, dentro de una familia de factores de crecimiento con importantes propiedades neuroprotectoras; que mejoran la neurogénesis y modulan la plasticidad sináptica (Agerman et al., 2003, Patterson, 2014, Failla et al., 2015).

Sin embargo, se ha visto que aunque una lesión por contusión cortical es capaz de estimular la proliferación en la SVZ, este incremento no resulta en un incremento en la neurogénesis del OB. Una explicación para este fallo en el que los neuroblastos inducidos por una lesión no incrementan la neurogénesis del OB puede ser debido a que la contusión cortical interrumpe el proceso de maduración normal desde la SVZ al OB, debido a una interrupción de la CMR (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996, Doetsch et al., 1997).

Todo lo anterior demuestra que los tres procesos implicados en la neuroreparación (angiogénesis, neurogénesis y plasticidad sináptica), se pueden producir de manera natural en el cerebro adulto tras diferentes situaciones patológicas; sin embargo, es de interés destacar que también podrían ser estimulados estos fenómenos de neuroreparación endógena, con diferentes tratamientos farmacológicos (Zhang and Chopp, 2009) o mediante terapia celular adicional (Font et al., 2010) y sus consiguientes beneficios.

7. Estrategias de rescate, reparación y regeneración tisular en el sistema nervioso central

El término reparación hace referencia al restablecimiento de la arquitectura y función tisular después de una lesión, sin que este conserve su estado original, por lo tanto siendo sus propiedades mecánicas y físicas inferiores. Esta reparación implica la proliferación de varias células y unas interacciones estrechas entre las células y la MEC. Si los tejidos lesionados son incapaces de un restablecimiento completo, o si las estructuras de soporte del tejido han resultado seriamente dañadas, la reparación se produce depositando tejido conjuntivo (fibroso), proceso denominado cicatrización. Sin embargo, algunos tejidos son capaces de reemplazar los componentes dañados y esencialmente retornar a un estado normal, con propiedades indistinguibles del tejido original; este proceso recibe la denominación de regeneración (Kumar et al., 2008).

En las lesiones cerebrales, las células del cerebro y, en particular, las neuronas debido a su gran sensibilidad, quedan dañadas o mueren. Por tanto, la neurorecuperación "rescate" tiene que englobar tanto reparación como regeneración, procesos que pueden estimularse con

terapias que promueven la supervivencia de las células dañadas y generan el reemplazo celular a partir de progenitores existentes en el sistema nervioso (Montaner, 2009) ya que el SNC compuesto de cerebro, medula espinal y retina tiene una capacidad limitada de regenerarse de manera espontánea.

Sin embargo, estrategias terapéuticas exitosas son difíciles de encontrar, por una parte debido a la complejidad del SNC y al medioambiente inhóspito en y alrededor de la lesión para el trasplante celular y por otra parte, debido a la difusión limitada de fármacos que atraviesen la BHE mediante métodos comunes de administración (como oral o intravenosa). Por ello, varias estrategias para promover la regeneración del tejido tras el daño están siendo buscadas, incluyendo terapias celulares y liberación local y controlada de moléculas bioactivas como pequeñas moléculas, factores de crecimiento y anticuerpos con sistemas de administración eficaces (Shoichet et al., 2008, Chen et al., 2010, Pakulska et al., 2012).

En concreto, nos vamos a centrar en las tres principales estrategias que están siendo estudiadas actualmente: el uso de antioxidantes, la terapia celular y el uso de biomateriales.

7.1. Terapia antioxidante

Como hemos mencionado previamente, el organismo cuenta con sistemas antioxidantes que protegen a las células del daño que pueden causar los agentes oxidantes. Estos sistemas se pueden dividir en enzimáticos o no enzimáticos (Sanchez et al., 2008). El primero corresponde a enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa, GPx y GSSG-R. Estos factores enzimáticos dependen de otros nutrientes esenciales como el selenio, el cobre o el zinc o vitaminas como la riboflavina. El segundo sistema antioxidante y paralelo al primero, está formado por depuradores no enzimáticos de las ERO; algunos de estos compuestos son el GSH, el LA, las vitaminas C, E, A y los carotenoides, entre otros (Clarkson and Thompson, 2000).

Diferentes criterios deben ser considerados cuando se evalúa el potencial antioxidante de un compuesto. Algunos de estos aspectos químicos y bioquímicos son:

- Especificidad de eliminación de radicales libres
- Actividad queladora de metales
- Interacción con otros antioxidantes
- Efectos en la expresión de genes

Otros criterios que son importantes cuando se consideran aplicaciones preventivas o terapéuticas son:

- Absorción y biodisponibilidad del compuesto
- Concentración en tejidos, células y fluido extracelular
- Localización en un campo acuoso, en la membrana celular o en ambos (Packer et al., 1995a).

Además, es necesario que el antioxidante tenga una baja toxicidad (Larghero et al., 2007).

Pero, aunque no es necesario que una sustancia cumpla todos estos criterios para ser considerado un buen antioxidante, un antioxidante "ideal" sí que los debería cumplir. La pareja

redox LA/DHLA se aproxima a este ideal, por eso es conocido como “un antioxidante universal” (Kagan et al., 1992).

7.1.1. Definición del ácido lipoico

El ácido lipoico, también conocido como ácido tióctico o 1,2-ditio-3-pentanoico; $C_8H_{14}O_2S_2$, y 1,2-ditio-3-ácido valérico, se aisló por primera vez del hígado bovino en 1950 (Reed, 2001). Al igual que el antioxidante GSH, el LA forma parte de una pareja redox, siendo esta la forma oxidada de su forma reducida, el ácido dihidrolipoico o 6,8-dimer-capto-ácido octanoico; $C_8H_{16}O_2S_2$ (DHLA; dihydrolipoic acid). Pero a diferencia del GSH en el que solo la forma reducida es antioxidante, tanto la forma reducida como la forma oxidada del LA son antioxidantes. El LA es reducido *in vivo* a su forma DHLA, el cual también posee actividad biológica, DHLA es un potente agente reductor con la capacidad de reducir la forma oxidada de varios antioxidantes importantes, incluyendo la vitamina C y el GSH (Jones et al., 2002).

Debido a su carbón asimétrico que tiene cuatro grupos diferentes unidos, el LA existe como dos enantiómeros, el enantiómero-R (ácido lipoico +) y el enantiómero S (ácido lipoico -) (Figura 14). El LA de origen natural es de forma R pero el LA sintético es una mezcla racémica de enantiómeros-R y enantiómeros-S (LA +/-) (Grasso et al., 2014). Este último será el utilizado en nuestros estudios.

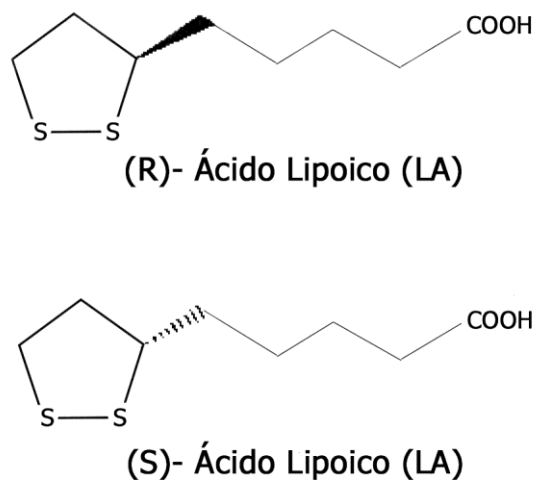


Fig.14. Estructura química de los enantiómeros R y S del LA. Adaptado de (Shay et al., 2009)

El ácido lipoico (LA) no se encuentra en nuestro cuerpo en una forma circulante libre detectable sino que se encuentra unido a residuos de lisina en proteínas. En su forma unida a proteínas, llamada lipoamida, el LA es requerido como cofactor de varios complejos multienzimáticos que catalizan reacciones críticas del metabolismo energético (Larghero et al., 2007, Grasso et al., 2014).

Pero además, el LA es fácilmente absorbido con la dieta (Packer et al., 1995a), en concreto en alimentos como carnes rojas, hígado, espinacas y levadura (Larghero et al., 2007, Kwiecien et al., 2013).

7.1.2. Biodisponibilidad y toxicidad del ácido lipoico

Como ya se ha mencionado, el ácido lipoico (LA) es absorbido con la dieta, pero, aunque está disponible en las fuentes nutricionales normales, en la dieta occidental no se consumen cantidades sustanciales de LA, por tanto son los suplementos dietéticos la fuente principal de LA, entre un rango de 50 mg a 600 mg. Por eso la mayoría de información referente a la biodisponibilidad procede de estudios realizados usando suplementos (Shay et al., 2009). La absorción gastrointestinal del LA parece ser bastante variable. Por ejemplo, Teicher y colaboradores, midieron el LA en plasma de diferentes voluntarios a los que se les había dado 200 mg de R, S-LA (la mezcla racémica obtenida por procesos de manufactura) y se observó que aproximadamente el 20-40% fue absorbido (Teichert et al., 1998). Pero esta biodisponibilidad puede fluctuar dependiendo de si es ingerido como un ácido libre o una sal y dependiendo de si se ingiere con la comida o no (Shay et al., 2009).

El ácido lipoico (LA) se acumula principalmente aunque de manera transitoria en el hígado, corazón y músculo esquelético, pero también se encuentra en otros tejidos. Pues se ha visto en diferentes estudios que el LA atraviesa la BHE. Estudios en los que se administró LA a dosis intravenosas de 25mg/kg de peso corporal en ratas resultó estar presente en la corteza cerebral a los 60 minutos de la administración (Panigrahi et al., 1996) y dosis intraperitoneales de 100 mg/Kg de peso corporal durante 7-14 días tanto en ratas jóvenes como adultas mostraron la acumulación del LA en varias regiones del cerebro (Arivazhagan et al., 2002).

En todos los modelos animales estudiados el LA y sus metabolitos son fácilmente excretados, principalmente en la orina (Biewenga et al., 1997). Por lo que el LA, tanto de fuentes dietéticas como de suplementos nutricionales es fácilmente absorbido, metabolizado y excretado, resultando en una cantidad insignificante de LA libre (Shay et al., 2009). Mientras que no se han establecido límites para el consumo de LA en humanos, sí que han sido definidos en animales, con diferencias según la especie. Para los perros, la dosis letal 50 (LD50; lethal dosage 50), que representa la dosis individual requerida para matar al 50% de la población de los animales estudiados, es de 400-500 mg/Kg de peso corporal (Packer et al., 1995a). Sin embargo, las ratas parecen ser más tolerantes y la LD50 se establece en > 2000 mg/Kg de peso corporal. Por lo tanto, se ha establecido el nivel de LA que no produce ningún efecto adverso (NOAEL; no observed adverse effect level) en ratas en 60 mg/Kg/día durante un periodo largo (Shay et al., 2009). También se ha visto en humanos que la administración intravenosa en dosis de 600 mg/día durante tres semanas no ha dado ningún efecto adverso (Ziegler et al., 1995). Tampoco se han visto efectos adversos en humanos tras la administración oral de 1800 mg de LA (600 mg tres veces por día) durante 6 meses (Ziegler et al., 1999a). No obstante, Cakatay y colaboradores realizaron una serie de experimentos en ratas de edad avanzada con administración intraperitoneal de LA racémico (100 mg/Kg de peso corporal/día) durante dos semanas y mostraron que estas dosis crónicas elevadas (el equivalente a 5-10 gramos/día en humanos) producen daños oxidativos (Cakatay and Kayali, 2005). Por lo tanto, se debe tener precaución con el uso de elevadas dosis de LA (Shay et al., 2009).

7.1.3. Propiedades del ácido lipoico

Hay muchas evidencias de que el ácido lipoico (LA) procedente de la dieta no puede ser usado como cofactor, sin embargo, lleva a cabo actividades bioquímicas con gran potencial farmacoterapéutico (Shay et al., 2009).

Este antioxidante protege a las células contra el daño producido por las ERO. Además es un quelador de metales. Es soluble en agua como en medio graso, por lo que es capaz de atravesar la BHE, neutralizando los radicales libres dentro de la membrana celular, en el citosol y en el espacio extracelular. Además, el LA interactúa con otros antioxidantes endógenos, siendo capaz de regenerarlos (Roy et al., 1997, Roy and Packer, 1998, Cakatay, 2006, Schreibelt et al., 2006, Shay et al., 2009, Szelag et al., 2012). Por lo tanto, el LA y DHLA actúan como antioxidantes no solo de forma directa, a través de la eliminación de los radicales y la quelación de metales, sino también de forma indirecta a través del reciclaje de otros antioxidantes y la inducción de un incremento intracelular de los niveles de GSH. Por último, hay evidencias de que puede tener efectos en proteínas reguladoras y en genes que están involucrados en el normal crecimiento y el metabolismo (Packer et al., 1995a). Por esta razón el LA es llamado "el antioxidante de los antioxidantes" (Goraca et al., 2011), pudiendo ser tenido como antioxidante "ideal", protector de otros antioxidantes.

7.1.4. Uso terapéutico del ácido lipoico en el sistema nervioso

Por todas estas propiedades descritas, el LA ha sido identificado como un potente agente terapéutico antioxidante en la prevención o tratamiento de condiciones patológicas mediadas por el estrés oxidativo (Bilska and Wlodek, 2005), incluyendo los trastornos neurodegenerativos (Packer et al., 1997, Evans and Goldfine, 2000, Smith et al., 2004, Salinthonne et al., 2008). Se ha estudiado pues el efecto neuroprotector del LA en las células neuronales, siendo un posible mecanismo su actividad queladora de metales (Ou et al., 1995), así como su actividad neuroprotectora en alteraciones del sistema nervioso caracterizadas por un daño vascular (Hager et al., 2007, Shay et al., 2009). Además, se sugirió que el LA juega un papel fundamental en la protección cardiovascular y puede también actuar como un agente anti-inflamatorio (Wollin and Jones, 2003, Smith et al., 2004, Skibska et al., 2006, Zhang et al., 2007b, Jesudason et al., 2008, Choi et al., 2010, Odabasoglu et al., 2011).

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado en un estudio realizado a corto plazo (15 días) que el LA es una estrategia farmacológica capaz de llevar a cabo procesos de neuroprotección y neovascularización tras un daño cerebral focal. El LA es capaz de restaurar los niveles de GSH tras un daño cerebral, reducir la apoptosis y la reactividad glial, aumentar la proliferación y estimular la angiogénesis (Rocamonde et al., 2012).

Se ha usado también en la dieta, por ejemplo como suplemento dietético para tratar diabéticos con neuropatía periférica (Ziegler et al., 1999b). En diferentes estudios con animales y humanos se ha visto que el LA puede proteger contra el daño ocular y otros daños del SNC. Estudios preliminares sugirieron que podía ser de ayuda para tratar el glaucoma (Filina et al., 1995), así como disminuir el estrés oxidativo y la muerte de fotorreceptores en modelos animales de retinosis pigmentaria (Komeima et al., 2006, Komeima et al., 2007, Sanz et al.,

2007). Además, hay evidencias de que el LA puede rescatar la muerte de fotorreceptores en daños inducidos por la luz, modelos de degeneración de la retina así como de degeneración macular relacionada con la edad (Zhao et al., 2014). También se ha demostrado como el LA protege contra diferentes tipos de daños como la disfunción renal (Bae et al., 2008) el daño de miocardio (Schonheit et al., 1995), o la enfermedad hepática inflamatoria (Bustamante et al., 1998, Bludovska et al., 1999, Marley et al., 1999), entre otros.

7.2. Terapia celular

Como hemos indicado anteriormente, el tejido neuronal tiene una capacidad de reparación limitada tras el daño cerebral. Por eso, otra de las terapias estudiadas con resultados prometedores para el tratamiento del daño cerebral son las terapias celulares (Roitbak et al., 2008, Miljan and Sinden, 2009, Bao et al., 2011, Zhao et al., 2015a).

Pero, a pesar de que las células madre embrionarias (ESC; embryonic stem cells) o el tejido fetal son fuentes apropiadas para la terapia celular, sus aplicaciones clínicas son limitadas debido a consideraciones éticas y otros problemas específicos como tumorigenicidad, viabilidad y compatibilidad antigénica (Vescovi et al., 1999, Blum and Benvenisty, 2008, Politis and Lindvall, 2012). Sin embargo, las células madre adultas (aCM) son una alternativa con resultados prometedores. En concreto las células madre mesenquimales (CMM), células derivadas del mesodermo, han sido aisladas de la médula ósea, el tejido adiposo, sangre del cordón umbilical, placenta y páncreas. Las CMM ejercen efectos inmunomoduladores, incluyendo la inhibición de la proliferación y la función de las células T, las células B y las células *natural killer*, por lo tanto reduciendo las reacciones inmunes e incrementando la tolerancia de los beneficiarios que van a ser trasplantados con estas CMM (Siegel et al., 2009). Estas propiedades inmunosupresoras convierten a estas células en fuentes alternativas importantes, ya que además, pueden ser aisladas de los propios donantes, expandidas y criopreservadas (Torrente and Polli, 2008, Kode et al., 2009, Li and Chopp, 2009, Bao et al., 2011). Otro aspecto fundamental es que estas células son capaces de mejorar la angiogénesis, neurogénesis y sinaptogénesis y así mismo, se ha visto en estudios realizados en ratas que las CMM disminuyen de manera significativa la formación de la cicatriz glial tras accidentes cerebrovasculares (Li et al., 2005). Por lo tanto, aunque los beneficios terapéuticos de las CMM probablemente no son atribuidos a las pocas CMM que logran diferenciar en células cerebrales (Lu et al., 2001), parece ser que estas células trabajan como generadores neurotróficos que promueven la recuperación funcional del cerebro mediante la angiogénesis, neurogénesis, sinaptogénesis y remodelación axonal. Aunque, el tratamiento óptimo (tipo de CMM, dosis celular, tiempo del tratamiento, vía de administración celular) está todavía por determinar. Para ello, en los siguientes apartados vamos a conocer un poco más sobre las células madre.

7.2.1. Células madre: Definición y propiedades

Se define como célula madre (CM) a aquella célula no diferenciada que es capaz de autorrenovarse y de diferenciarse en otros tipos celulares.

Las células madre presentan dos tipos de divisiones: la simétrica y la asimétrica. La característica de autorrenovación viene dada a través de la división simétrica. En ella las CM se dividen para dar dos células hijas que conservan las mismas propiedades de la CM de la que proceden. Mientras que la división asimétrica da lugar a células progenitoras en un estado más diferenciado que la CM inicial.

Bajo las condiciones apropiadas y recibiendo los estímulos correctos, las CM pueden diferenciarse hacia algunos, muchos o todos los tipos de células especializadas de un organismo maduro. Es lo que se conoce como potencialidad de las CM, la cual dependerá en gran medida de su origen, es decir, del estadio del desarrollo y de la zona del organismo donde reside (McKay, 2000, Lovell-Badge, 2001, Temple, 2001). Dependiendo de su potencialidad pueden clasificarse en:

Totipotente: si es capaz de generar todas las células del embrión y del tejido extraembrionario. Únicamente los cigotos poseen este potencial.

Pluripotente: si puede crear todos los tipos celulares que formarán el embrión. Son ejemplos las CM embrionarias.

Multipotente: si sólo es capaz de generar los tipos celulares del tejido de donde proviene. Son la mayoría de las CM del adulto.

Unipotente: si tan solo puede dar lugar a un único tipo celular. Son también denominadas como progenitoras.

Actualmente, sabemos que existen CM en todas las etapas del desarrollo de un organismo, desde el inicio hasta su muerte. La CM por excelencia es el óvulo fecundado o cigoto. Es totipotente y a partir de ella se desarrollan todas las células que darán lugar al organismo, tanto las células somáticas como las germinales, incluidas las células extraembrionarias que formarán la placenta. A medida que el embrión se desarrolla, las CM van dividiéndose, migrando y diferenciándose en todos los tipos celulares que formarán los distintos órganos. Esto lo harán siguiendo una compleja secuencia de expresiones génicas orquestada por precisos programas genéticos y regulados por la información de las células vecinas, en un patrón espacio-temporal muy definido. En este proceso las células van especializándose cada vez más y su potencialidad va reduciéndose (Gage, 2000, Temple, 2001). Es importante tener en cuenta que la propia definición de CM o su clasificación en subtipos son puramente funcionales y no morfológicas. Atiende a propiedades observadas experimentalmente y bajo condiciones muy particulares. Estas propiedades pueden ser diferentes dependiendo de si consideramos a la célula en su entorno natural *in vivo*, si está siendo cultivada *in vitro*, o si ha sido trasplantada otra vez *in vivo* en emplazamientos homotópicos o ectópicos.

7.2.2. Células madre: Tipos y orígenes

Las fuentes de células madre (CM) son numerosas y se pueden agrupar en dos tipos principales de acuerdo a su origen: las células madre embrionarias (ESC) y células madre adultas (aCM) (Montiel-Eulefi, 2011) (Figura 15).

-Las ESC son células aisladas de la masa celular interna de un embrión pre-implantacional en el estadio de blastocisto (día 4-5 de gestación en humanos o día 4 en ratones). Son células pluripotenciales, con capacidad de generar todos los tipos celulares de un organismo, incluidas las células germinales, aunque no pueden dar lugar a las células de la placenta. Tienen el problema de la posible generación de un rechazo inmunológico y un elevado riesgo de formación de teratomas si son trasplantadas en estado proliferativo, lo que obliga a una máxima cautela antes de ser utilizadas en ensayos de terapia celular para pacientes (Olsson et al., 1997, Bjorklund et al., 2002, Politis and Lindvall, 2012).

-Las células madre embrionarias germinales (EGC; embryonic germ cells) son células provenientes de embriones más desarrollados. Se aíslan de los precursores germinales extraídos de los primordios de las gónadas de un embrión post-implantacional (5-10 semanas de vida en humanos). Estas células son las que darán lugar, en el adulto, a los gametos. Son pluripotenciales, por lo que pueden generar todos los tipos de células, tanto somáticas como germinales, pero no extraembrionarias. En este caso no desarrollan teratomas después de su implante (Shamblott et al., 1998, Rosenthal, 2003).

Sin embargo, aunque las ESC poseen una gran capacidad proliferativa que las convierte en una fuente inagotable (Xue et al., 2005), el trabajo con células de embrión humano tiene limitaciones técnicas y éticas; lo que no se plantea con el uso de distintos procedimientos de recolección de CM de tejidos adultos (Montiel-Eulefi, 2011).

-Las células madre fetales se encuentran formando parte de los tejidos que forman los órganos fetales. Su potencial de diferenciación es similar al de las aCM, aunque parecen mostrar mayor capacidad de expansión y diferenciación que éstas al encontrarse en un estado más primitivo (Shamblott et al., 1998).

Es posible por tanto, aislar células que cumplan las dos condiciones básicas que las definen como CM, tanto de los órganos fetales en desarrollo, como de un organismo adulto, aunque con capacidades de expansión y diferenciación reducidas. Normalmente son consideradas como multipotenciales: pueden dar lugar a los tipos celulares presentes solamente en el propio tejido al que pertenecen. Estas células generan los llamados precursores o progenitores, que están a su vez mucho más restringidos. Los progenitores pueden dividirse, aunque no indefinidamente, y su potencial se limita ya a un solo tipo de célula madura y especializada (Temple, 2001). En el cerebro, las células multipotenciales son las CMN. Las CMN pueden aislarse del cerebro en desarrollo o en el adulto (Gage, 2000, Temple, 2001).

Sin embargo, la dificultad de obtención y la elevada antigenicidad de estas células suponen un problema importante a la hora de su aplicación en pacientes. La necesidad de fuentes alternativas a las CMN ha generado la búsqueda y el desarrollo de otras células, y así

se ha avanzado en la utilización de aCM procedentes de otros órganos que sean capaces de diferenciarse hacia distintas estirpes celulares (Otero et al., 2012).

-Las CM de origen adulto son células indiferenciadas aisladas de órganos o sistemas completamente desarrollados en el estadio adulto. En principio, son consideradas multipotenciales, dando lugar exclusivamente a células adultas del tejido en el que se localizan. Aunque se encuentran en muy pocas cantidades, se ha demostrado la presencia de aCM en numerosos tejidos: médula ósea, músculo esquelético, hígado, páncreas, epitelio de la dermis y del intestino, grasa, pulpa dental, córnea y retina del ojo, y en el SNC, incluyendo el cerebro y la médula espinal. Pero sin duda, el tejido considerado como la mayor fuente de aCM es la médula ósea (Toma et al., 2001). Estas células son las encargadas de realizar la imprescindible autorrenovación y mantenimiento de la homeostasis tisular.

Algunas aCM no sólo se especializan a células del mismo tejido en el que residen, sino también a otras células que derivan de la misma capa embrionaria de la que proceden (Prockop, 1997). De modo que, por ejemplo, CM procedentes de la capa ectodérmica van a ser capaces de especializarse a células epiteliales, o células procedentes del endodermo podrán dar lugar a células pancreáticas (Weissman et al., 2001).

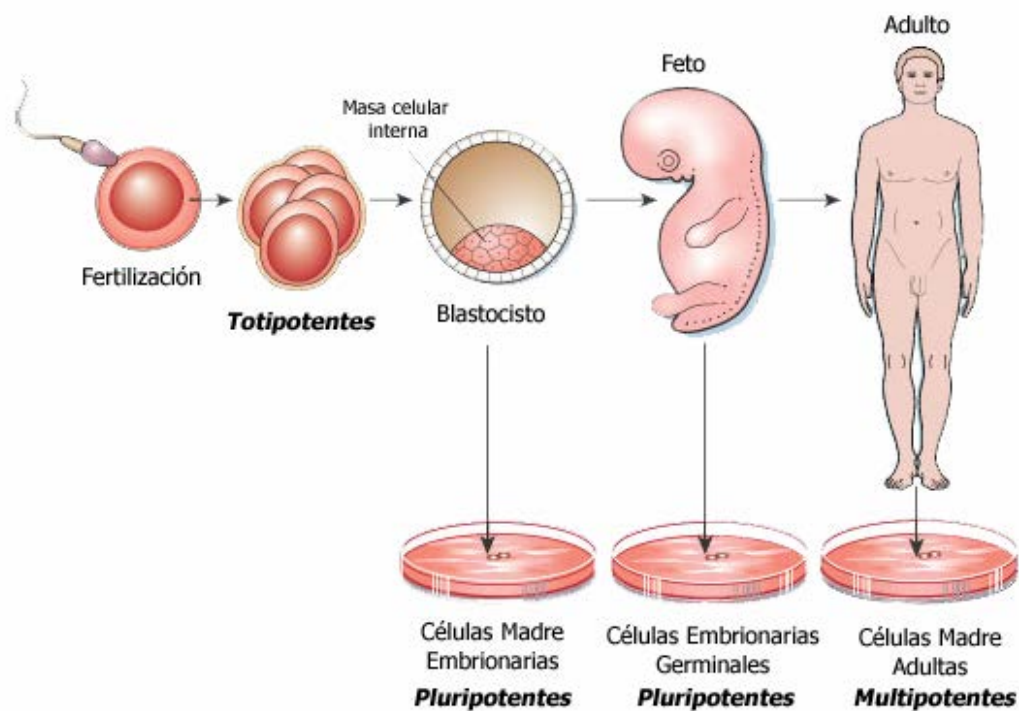


Fig.15. Tipos de células madre según su origen. Adaptado de (Liuzzi and Lasek, 1987)

-Por último las células madre pluripotentes inducidas (iPSC; induced pluripotent stem cells) son el resultado de la reprogramación de células somáticas hasta un estado similar al embrionario. Ello se consigue mediante la expresión de factores de transcripción y posterior cultivo en las mismas condiciones que las ESC. La disponibilidad de cualquier tipo celular a partir de iPSC procedentes de cualquier individuo adulto supone una enorme revolución para la nueva biomedicina.

7.2.3. Células derivadas de la médula ósea

A lo largo de las últimas décadas se ha llegado al conocimiento de que las ESC humanas no son la única fuente existente de CM potencialmente útiles para la reparación de órganos y tejidos. Diversos autores han demostrado que la administración terapéutica de las aCM tras una lesión en diferentes órganos permite la reparación tisular y obtener efectos beneficiosos desde el punto de vista funcional (Zurita and Vaquero, 2006, Vaquero and Zurita, 2011, Anbari et al., 2014).

Una de las fuentes más importantes de obtención de aCM propuestas en investigación para terapias celulares es la médula ósea. Las aCM procedentes de la médula ósea son relativamente fáciles de aislar y sencillas de manipular *in vitro*. Además, estas células poseen baja antigenicidad, lo que permite que el trasplante pueda ser incluso alogénico. Por último, no se ha observado ninguna formación de tumores en procesos experimentales a causa de la utilización de aCM (Pittenger et al., 1999).

La médula ósea llena el espacio existente entre las trabéculas óseas de la sustancia esponjosa y el espacio tubular interno de los huesos largos de los miembros. Representa alrededor del 5% del peso corporal. Mientras que en los neonatos toda la médula ósea forma células sanguíneas, en el adulto la hematopoyesis se limita a ciertas regiones: vértebras, costillas, esternón, coxales, epífisis proximales del húmero y el fémur. En el resto de las cavidades medulares la médula ósea hematopoyética es reemplazada por tejido adiposo. La médula formadora de células sanguíneas se llama médula ósea roja mientras que la médula reemplazada por tejido adiposo recibe el nombre de médula ósea amarilla.

Además de contener células madre hematopoyéticas (HSC; hematopoietic stem cells) que pueden diferenciarse en todas las células de la sangre, en la médula ósea hay CMM, que pueden continuar su desarrollo para convertirse en células del tejido conjuntivo o células musculares, así como otro tipo de CM con la potencialidad de diferenciarse en células hepáticas, endoteliales y nerviosas (Welsch, 2008, Zhang et al., 2010, Ding et al., 2011) (Figura 16).

Las CMM representan menos del 0,01% del total de la población celular de la médula ósea. Son relativamente fáciles de aislar y fueron identificadas por primera vez en la rata por Friedenstein et al (Friedenstein, 1976). En humanos se aíslan generalmente de la cresta ilíaca. Muestran multipotencialidad para diferenciarse en cultivo o tras su implante *in vivo* (Barry and Murphy, 2004, Ding et al., 2011). Originariamente, se pensaba que las CMM eran células capaces de diferenciarse a elementos únicamente procedentes del mesodermo, como osteoblastos, adipocitos y condrocitos o células musculares. Sin embargo, en los últimos años se sabe que las CMM adultas poseen la capacidad de generar distintos tipos celulares especializados, diferentes al de su origen embrionario, fenómeno definido como “transdiferenciación”. Los datos recogidos de la literatura sugieren que las CMM tienen la capacidad de transdiferenciarse *in vitro* hacia células nerviosas (Sanchez-Ramos et al., 2000, Woodbury et al., 2000, Vaquero and Zurita, 2011), lo que ha llevado a su utilización como terapia celular en lesiones del SNC.

Por lo tanto, cuando hablamos de células derivadas de la médula ósea (BMDC; bone marrow derived cells) estamos hablando de todo este conjunto de células provenientes de la médula ósea que bajo condiciones homeostáticas abandonan la médula ósea, circulan en la sangre y contribuyen a la reparación de los tejidos en respuesta al daño de los mismos (Jones and Rankin, 2011).

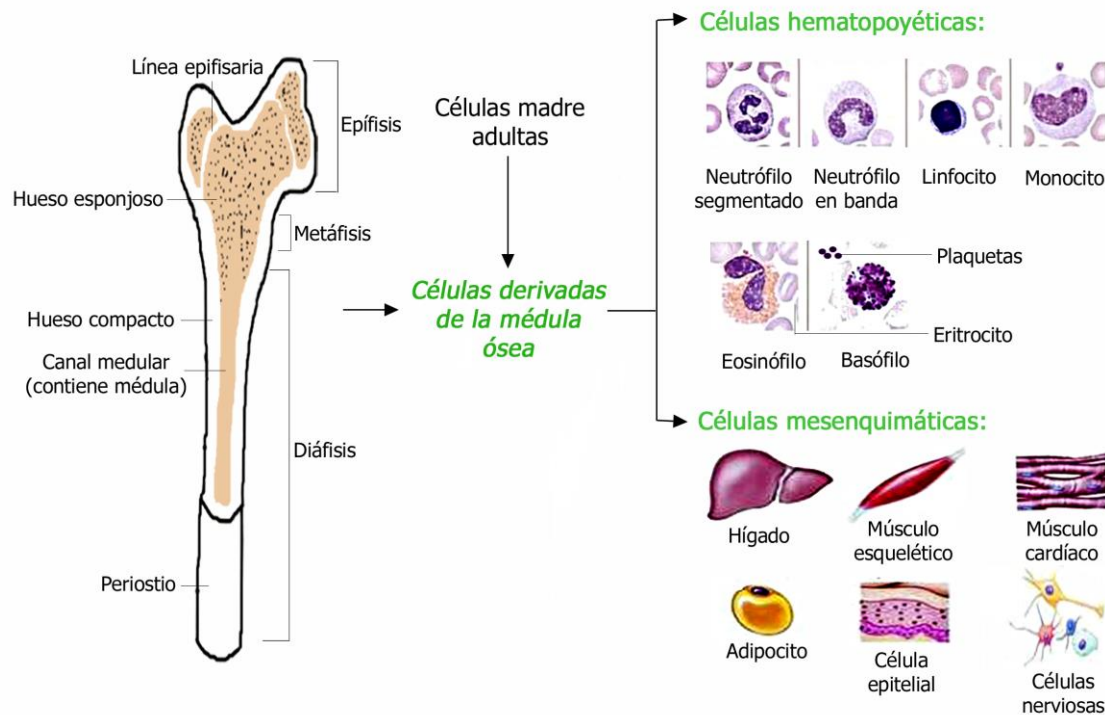


Fig.16. Esquema representativo de la médula ósea y del conjunto de células provenientes de la médula ósea, tanto células hematopoyéticas como células mesenquimáticas (Carr and Rodak, 2010).

7.2.4. Aplicación de la terapia celular en el sistema nervioso

Debemos resaltar que estudios recientes indican que la terapia celular podría ser un acercamiento válido para recuperar alteraciones del SNC como el daño cerebral traumático (Kuroda et al., 2011), recuperación que actualmente no se puede llevar a cabo mediante estrategias terapéuticas tradicionales (Savitz and Fisher, 2007).

Ha sido demostrado que tras una isquemia cerebral, las BMDC infiltran rápidamente el parénquima cerebral, diferenciándose principalmente en microglía (Priller et al., 2001, Beck et al., 2003, Hess et al., 2004) o células endoteliales (Hess et al., 2002, Zhang et al., 2002) y un número limitado de células también expresaron marcadores astrocíticos (Eglitis et al., 1999, Anbari et al., 2014) y neuronales (Hess et al., 2002, Cogle et al., 2004, Hess et al., 2004, Zhang et al., 2010, Anbari et al., 2014). Por lo tanto, se ha visto que el reclutamiento de BMDC tras un accidente cerebrovascular representa un intento de autorreparación endógena y por ello estas células pueden representar una nueva estrategia terapéutica para estimular la revascularización y reparación, suponiendo una vía para el suministro de genes terapéuticos (Kokovay et al., 2006).

Por otra parte, las CMM trasplantadas pueden promover de manera directa o indirecta la neuroprotección o neuroregeneración y la angiogénesis actuando como mini-bombas repartiendo factores beneficiosos al microambiente del cerebro dañado (Tate and Case, 2012a). Se ha visto que las CMM producen citoquinas neurotróficas, como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF; hepatocyte growth factor) (Chen et al., 2002), VEGF (Chen et al., 2003a), factor de crecimiento nervioso (NGF; nerve growth factor) (Li et al., 2002), BDNF (Chen et al., 2002, Li et al., 2002), FGF (Chen et al., 2003a), IGF-1 (Zhang et al., 2004), todos ellos importantes en el proceso de neurogénesis y angiogénesis. Además, se ha sugerido que la liberación del TGF β ayuda a reducir la formación de la cicatriz glial y, por lo tanto ayuda en la restauración del flujo sanguíneo cerebral y la BHE en modelos de daño cerebral traumático y accidentes cerebrovasculares (Kokovay et al., 2006).

Tras varias observaciones sobre las CMM se puede concluir que la administración experimental de una suspensión de CMM obtenidas del estroma de la médula ósea se asocia a una progresiva recuperación funcional en modelos experimentales de hemorragia intracerebral. Esta mejora funcional puede atribuirse a un efecto sinérgico de las células trasplantadas. Por una parte, las CMM trasplantadas al cerebro pueden sobrevivir en el cerebro huésped y diferenciarse hacia células de glía y neuronas. Por otra parte, las CMM liberan factores tróficos que ejercen un efecto neuroprotector y neuroregenerador en el cerebro lesionado al activar la neurogénesis endógena y evitar que los neuroblastos formados presenten fenómenos de apoptosis (Otero et al., 2012).

De forma interesante, en un estudio reciente, Kawabori y colaboradores, resaltaron las dos rutas principales de administración de BMDC en un modelo de accidente cerebrovascular en rata: administración intracerebral respecto a la intravenosa, en el que las células se inyectaron 7 días tras producirse el daño cerebral. Este estudio demuestra de forma clara que las BMDC mejoran de forma significativa la recuperación funcional tras el infarto cerebral en ratas, cuando estas células son trasplantadas dentro del tejido cerebral (Kawabori et al., 2012).

En otros estudios también se han explorado varias rutas de administración de CM, como son la intravenosa, intracerebral, intraarterial e intraventricular para determinar sus beneficios terapéuticos y los mecanismos involucrados en el accidente cerebrovascular (Wu et al., 2010). Se eligió la inyección intracerebral porque las células podían ser trasplantadas de forma precisa en el estriado del cerebro isquémico para mayor aprovechamiento, mientras que en la inyección vascular podría ocurrir que las CM quedasen atrapadas en los órganos sistémicos, de modo que pocas de estas CM alcanzarían el hemisferio isquémico del cerebro (Li et al., 2010). Además, estudios previos mostraron que tanto un trasplante temprano como retardado de las CMN reducía el volumen de tejido infartado, mejoraba los resultados neuroconductuales, e incrementaba la angiogénesis y neurogénesis. Sin embargo, la supervivencia celular era más elevada en transplantes tempranos tras el accidente cerebrovascular (Darsalia et al., 2011).

Por todos estos beneficios observados en otros estudios mediante una terapia tanto antioxidante como celular tras un daño en el SNC, en esta tesis se estudian los posibles

beneficios terapéuticos individuales y sinérgicos del tratamiento con LA y BMDC tras daño cerebral focal inducido por criolesión.

7.3. Uso de biomateriales con fines reparativos

En el campo de la ingeniería tisular se está produciendo un creciente interés por diseñar nuevos biomateriales compatibles con el sistema nervioso (Cao et al., 2013). Se han obtenido excelentes respuestas *in vitro* por parte de diversos biomateriales en términos de supervivencia y diferenciación celular (Soria et al., 2006, Soria et al., 2007, Martínez-Ramos et al., 2008). Además, en el estudio en paralelo *in vivo* e *in vitro*, materiales poliméricos formados por etil acrilato (EA) e hidroxietil acrilato (HEA) han sido estudiados recientemente, también en nuestro grupo, con fines neuroregenerativos y resultados prometedores (Soria et al., 2006, Campillo-Fernández et al., 2007, Veiga et al., 2011), observándose que, la colocación de un *scaffold* en el área dañada o cavidad puede proporcionar soporte para el tejido cerebral circundante, funcionando como sustrato para el crecimiento celular, la regeneración de axones y para la formación de neuritas (Tsai et al., 2004, Veiga et al., 2011, Martínez-Ramos et al., 2012, Martínez-Ramos et al., 2015).

Adicionalmente, la sustitución de los tejidos dañados con *scaffolds* que además contienen fármacos podrían ayudar a promover la regeneración y la recuperación funcional de este tejido dañado (Willerth and Sakiyama-Elbert, 2007, Nitta and Numata, 2013).

Pero todas las estrategias experimentales obedecen a una misma idea básica: favorecer la supervivencia de las neuronas lesionadas y proporcionar a los axones los factores y el entorno adecuado para que puedan crecer y ser funcionales.

Por tanto, una combinación del uso de fármacos antioxidantes junto con células liberadas en un *scaffold* adecuado sería de gran interés en futuras investigaciones relacionadas con estrategias regenerativas y de reparación tisular.

HIPÓTESIS

Las hipótesis que se proponen en este trabajo son las siguientes:

Hipótesis 1. El uso de ácido lipoico aplicado *in vitro* e *in vivo* como tratamiento tras una lesión cerebral focal es capaz de disminuir el estrés oxidativo y como consecuencia aumentar la capacidad de supervivencia celular tras la lesión, permitiendo la reparación y reorganización del tejido nervioso y vascular.

Hipótesis 2. El trasplante de células derivadas de la médula ósea es una estrategia alternativa para tratar el daño cerebral focal facilitando la reparación del tejido dañado, pudiendo tener efectos sinérgicos al combinarlo con el tratamiento farmacológico de ácido lipoico.

OBJETIVOS

Por todo ello en este proyecto se plantean tres objetivos:

1. Analizar *in vitro* el efecto del ácido lipoico sobre la viabilidad celular y el estrés oxidativo tras el uso de diferentes estresores celulares en cultivos primarios de la corteza cerebral. Así como evaluar *ex vivo* el efecto del ácido lipoico en una situación de estrés oxidativo provocada químicamente.

2. Estudiar *in vivo* el efecto del ácido lipoico sobre poblaciones de astrogliá, microglía así como el efecto sobre la angiogénesis local tras daño cerebral focal por criolesión.

3. Analizar *in vivo* el posible beneficio terapéutico del trasplante de células derivadas de la médula ósea tras la criolesión, comparando sus efectos con los observados tras el tratamiento con ácido lipoico y con los observados tras una terapia combinada que incluya terapia celular asociada a una terapia farmacológica tras la lesión cerebral.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

Para el desarrollo de este proyecto de investigación, la parte experimental se llevó a cabo en tres laboratorios distintos en los cuales, por motivos técnicos, se utilizaron cepas murinas diferentes:

C57BL/6: cepa de ratones macho Holandeses, procedentes del laboratorio de Charles River (Calco, Italia), utilizados en el Instituto Científico San Raffaele de Milán (Italia) para la sección experimental 2.1. Los animales que se utilizaron fueron ratones post-natal 0 (PN0) de estas cepas mantenidas en las instalaciones propias del estabulario del Hospital San Raffaele. También se utilizaron ratones adultos de esta cepa C57BL/6 procedentes del laboratorio de Harlan (Barcelona, España) con un peso de aproximadamente 30-40g en la Universidad CEU-Cardenal Herrera de Moncada, en Valencia (España) para la sección experimental 2.2.

Wistar: cepa de ratas macho albinas Italianas, procedentes del laboratorio de Harlan (Barcelona, España), utilizados en la Universidad CEU-Cardenal Herrera de Moncada, en Valencia (España) para la sección experimental 2.3. Los animales tenían un peso al inicio del experimento de aproximadamente 250-300 g. Se dejaron aclimatar durante una semana antes de iniciar los experimentos.

CD1: cepa de ratones macho albinos Holandeses, procedentes del laboratorio de Harlan (Barcelona, España), utilizados en el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) de Sevilla (España) para la sección experimental 2.3. Los animales tenían un peso al inicio del experimento de aproximadamente 30-40g. Se dejaron aclimatar durante una semana antes de iniciar los experimentos.

GFP⁺/CD1: cepas de ratones macho transgénicos (Tg (CAG-EGFP) B5Nagy/J_N°003115) modificadas para la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP; Green Fluorescent Protein) en fondo genético CD1, procedentes del laboratorio de Jackson (California, Estados Unidos) y mantenidas en las instalaciones propias del estabulario del CABIMER, para la sección experimental 2.3. Esta cepa se empleó como donante de las células para el trasplante y su seguimiento.

1.1. Condiciones de estabulación y manejo de los animales

La estabulación se realizó en cada una de las diferentes instalaciones de los tres centros (Hospital San Raffaele, CABIMER y Universidad CEU-Cardenal Herrera) donde se mantuvieron en jaulas en condiciones controladas de temperatura (20°C) y humedad (60%) bajo ciclos constantes de luz-oscuridad de 12 horas. Durante su estabulación tuvieron libre acceso al agua y la comida.

La manipulación y cuidado de los animales se realizó siguiendo la Normativa del Real Decreto 1201/05 y el Consejo Europeo de Comunidades (Directiva 2010/63/EU de Septiembre 22, 2010) y los protocolos fueron previamente aprobados tanto por la Comisión de Ética del Bienestar Animal de la Universidad CEU-Cardenal Herrera como del CABIMER y del Hospital San Raffaele. Además, se tuvo la precaución de evitar cualquier estrés innecesario o infligir

dolor a los mismos. El número de animales se redujo al mínimo necesario para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos. El sacrificio de los animales se llevó a cabo mediante la técnica más incruenta, rápida e indolora que, por otra parte, no influyera en las variables consideradas en cada experimento.

1.2. Distribución y número de animales usados

Se utilizaron ratas o ratones según el experimento, es decir, el laboratorio de ejecución, distribuidos en los siguientes grupos:

1.2.1. Modelo de tratamiento con ácido lipoico en situación de estrés oxidativo *in vitro*

- 16 ratones machos C57BL/6 PN0 utilizados para el cultivo primario de la corteza cerebral y posterior expansión de las células.

1.2.2. Modelo de tratamiento con ácido lipoico en situación de peroxidación lipídica *ex vivo*

- 5 ratones controles machos adultos C57BL/6

1.2.3. Modelo de tratamiento con ácido lipoico tras criolesión a corto y largo plazo *in vivo*

- 44 ratas machos adultas Wistar repartidas como sigue:
 - Grupo Control 15 días:6
 - Grupo CR 15 días:10
 - Grupo CR+LA 15 días:10
 - Grupo Control 60 días:6
 - Grupo CR 60 días:6
 - Grupo CR+LA 60días:6

1.2.4. Modelo de tratamiento con ácido lipoico y células derivadas de la médula ósea tras criolesión *in vivo*

- 70 ratones machos adultos CD1 repartidos como sigue:
 - Grupo Control:14
 - Grupo CR:14
 - Grupo CR+LA:14
 - Grupo CR+BMDC:16
 - Grupo CR+LA+BMDC:16
- 3 ratones machos adultos GFP⁺/CD1 como donantes de las células para el trasplante

2. Diseño experimental y metodología

En este trabajo se detalla por una parte el estudio *in vitro* basado en la determinación de la viabilidad celular y el estrés oxidativo con el tratamiento de LA tras el uso de diferentes estresores celulares en cultivos primarios de la corteza cerebral. Así como el estudio *ex vivo* del

tratamiento de LA en un estrés oxidativo obtenido mediante la estimulación de la peroxidación lipídica a partir de sales de Fe (II) y ácido ascórbico. Por otra parte, se detalla el estudio *in vivo* del tratamiento con LA como estrategia reparativa tras el modelo de criolesión (CR) en la corteza cerebral a corto y largo plazo y por último, el estudio *in vivo* del efecto del trasplante de BMDC tras el modelo de CR, comparando sus efectos con los observados tras el tratamiento con LA y evaluando el posible efecto sinérgico aplicando ambos tratamientos.

2.1. Estudio *in vitro*

2.1.1. Cultivos celulares

2.1.1.1. Realización del cultivo primario de la corteza cerebral

El cultivo primario de la corteza cerebral se realizó siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

Primero, se cubrieron los flask P-75 con Matrigel 1:100 (Sigma Aldrich, Milán, Italia) diluido con medio modificado (DMEM/F12; Dulbecco's Modified Eagles's Medium/Nutrient Mixture F12) (Sigma Aldrich, Milán, Italia). Seguidamente, se diseccionaron las cabezas de los ratones P₀ en una placa con tampón fosfato salino (PBS; phosphate buffered saline) y Penicilina-Estreptomicina al 1% (Pen/Strep) (Sigma Aldrich, Milán, Italia). Se hicieron lavados continuados de los cerebros con esta solución. Posteriormente, se introdujeron los cerebros diseccionados en un tubo estéril (Falcon) con el PBS-Pen/Strep y se cortaron en porciones muy pequeñas. A continuación, esto se homogenizó con Tripsina-DNasa al 1% (Sigma Aldrich, Milán, Italia) y la ayuda de una micropipeta y se dejó 15 min a 37 °C en el incubador. Tras estos 15 min, se añadió el mismo volumen usado de Tripsina-DNasa al 1%, de medio constituido de suero fetal bovino al 10% (FBS; fetal bovine serum) (Sigma-Aldrich, Milán, Italia), Pen/Strep al 1% y glutamina 2mM (Gln) (Sigma Aldrich, Milán, Italia), para inhibir la tripsina. Todo esto se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min. Tras quitar el sobrenadante, el pellet se resuspendió y homogenizó con este medio, se filtró con un *cell strainer* de 70 µm (BD Falcon, California, USA) y se cultivó en los flasks de P75 que se habían cubierto previamente con el Matrigel.

Se realizaron 2 pases celulares en algunos de los flask cultivados, con la finalidad de expandir estas células y obtener la cantidad celular necesaria para todo el estudio.

En cuanto obtuvimos la densidad celular requerida, se establecieron las condiciones óptimas de cultivo para el experimento y por tanto se cultivaron las células en placas de 96 pocillos a una densidad de 50.000 células/pocillo con el medio constituido por FBS al 10%, Pen/Strep al 1% y glutamina 2 mM.

2.1.1.2. Administración de los estresores celulares y el ácido lipoico mediante post-tratamiento

Determinados los parámetros de cultivo (50.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos) se definieron los cinco grupos de estudio para el análisis del post-tratamiento:

Grupo 1. Cultivo

Grupo 2. LPS 0,001 mg/ml + DOP 50 µM 36 h + Medio 24 h

Grupo 3. LPS 0,001 mg/ml + DOP 50 µM 36 h + LA 100 µM 24h

Grupo 4. BSO 1 mM 36 h + Medio 24 h

Grupo 5. BSO 1 mM 36 h + LA 100 µM 24 h

Por una parte, para el estudio de la viabilidad celular mediante el bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazolil)-2,5-tetrazolio (MTT), se cultivaron tres pocillos de la placa de 96 pocillos para cada uno de los grupos y el estudio se realizó por triplicado. Para el estudio de la muerte celular mediante inmunofluorescencia, se utilizaron de nuevo tres pocillos de la placa de 96 pocillos para cada uno de los grupos y el estudio también se realizó por triplicado. Por último, para el estudio del estrés oxidativo mediante la determinación del GSH, GSSG y glutamato se utilizaron 9 pocillos para cada uno de los grupos y el estudio se realizó también por triplicado (Figura 17).

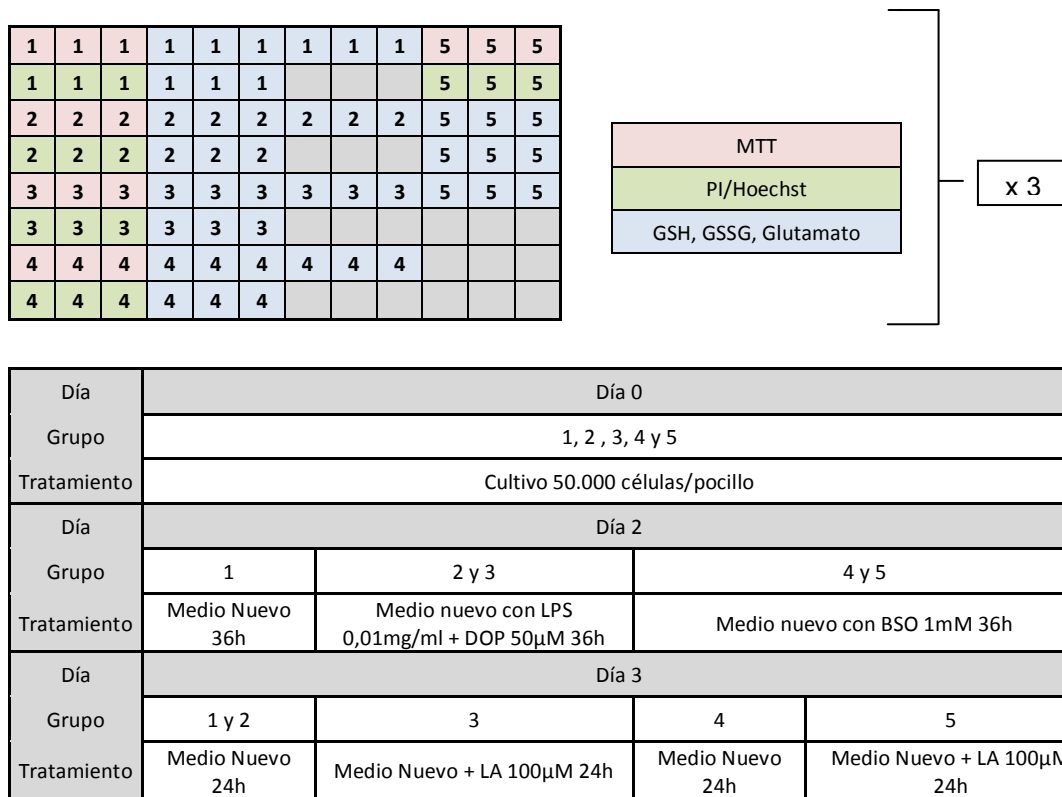


Fig.17. Desarrollo experimental del modelo de tratamiento con ácido lipoico en situación de estrés oxidativo in vitro. Se muestra una representación de la placa de 96 pocillos donde se realizó el cultivo celular y la distribución de los cinco grupos de estudio. Seguidamente se representa el tratamiento seguido en cada uno de ellos.

En primer lugar, se cultivaron todos los pocillos a una concentración de 50.000 células/pocillo. A los dos días, en los pocillos del grupo 1 se cambió el medio (10 % FBS-Pen/Strep-Gln), por medio nuevo (10 % FBS-Pen/Strep-Gln), sin embargo, el resto de pocillos se trataron con los estresores respectivos utilizados que se detallan a continuación:

-Una combinación de LPS disuelta en medio (10 % FBS-Pen/Strep-Gln) y filtrada con el *cell strainer* de 70 µm, junto con Dopamina disuelta en PBS y filtrada con el *cell strainer* de 70 µm.

-BSO disuelto en medio (10 % FBS-Pen/Strep-Gln) y filtrado con el *cell strainer* de 70 μm .

Para obtener las concentraciones necesarias de cada uno de estos estresores, estos se diluyeron finalmente con el medio (10 % FBS-Pen/Strep-Gln).

Por tanto, tras estos días de cultivo, los pocillos del grupo 2 y 3 se trataron con LPS 0,001 mg/ml + Dopamina 50 μM durante 36 h. Por otra parte, los pocillos del grupo 4 y 5 se trataron con BSO 1 mM durante 36 h. Pasadas estas 36 h, a los pocillos de los grupos 1, 2 y 4 se les cambió el medio con los estresores por únicamente medio nuevo (10 % FBS-Pen/Strep-Gln) durante 24 h. Mientras que a los pocillos de los grupos 3 y 5 se les cambió el medio con los estresores por un medio con LA 100 μM durante 24 h.

2.2. Estudio *ex vivo*

2.2.1. Modelo de inducción de la peroxidación lipídica en homogenado de cerebro de ratón

En segundo lugar, se realizó el estudio *ex vivo* del tratamiento con LA en un estrés oxidativo provocado mediante la estimulación de la peroxidación lipídica a partir de sales de Fe (II) y ácido ascórbico. Para esto se siguió el modelo experimental modificado de Fraga y colaboradores (Fraga and Tappel, 1988) tal y como se ha mencionado en el apartado 5.3. de la introducción y que se detalla a continuación:

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los cerebros de los cuales se desecharon el bulbo olfatorio y el cerebelo. Primero se añadieron 10 ml de tampón fosfato 0,1 M a un tubo esteril (Falcon) de 50 ml en el que se habían depositado los cerebros de ratón diseccionados. Seguidamente, se homogenizaron con el ultraturax T25 (Laborteck, Staufen, Alemania) a 13.000 rpm durante 3 min. Finalmente, se centrifugó el homogenado a 6000 rpm durante 4 min y se extrajo el sobrenadante.

A continuación, se prepararon las diferentes concentraciones de antioxidante, para ello primero se preparó una concentración madre de 5 mM de LA disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, Madrid, España), y a partir de aquí se prepararon concentraciones intermedias de 0-50-100-200-400 y 1000 μM del LA diluido en DMSO.

Luego, se añadieron en diferentes viales 268 μL del homogenado de cerebro de ratón (7,46mg/ml) + 3 μL de LA (a las diferentes concentraciones intermedias para obtener las concentraciones finales de 0-0,5-1-2-4 y 10 μM). Seguidamente, se añadieron 19 μL de ácido ascórbico (Sigma Aldrich, Madrid, España), con el fin de obtener una concentración final en el vial de 0,50 mM en 300 μL totales. Por último, previo a la incubación, se añadieron 10 μL de FeSO_4 (Guinama, Valencia, España), para tener una concentración final en 30 μL de 0,05 mM. Se incubaron las muestras a 37 °C durante dos horas con los viales abiertos y al terminar se paró la reacción de peroxidación añadiendo 10 μL de butil hidroxitolueno (BHT) (Guinama, Valencia, España) (Figura 18).

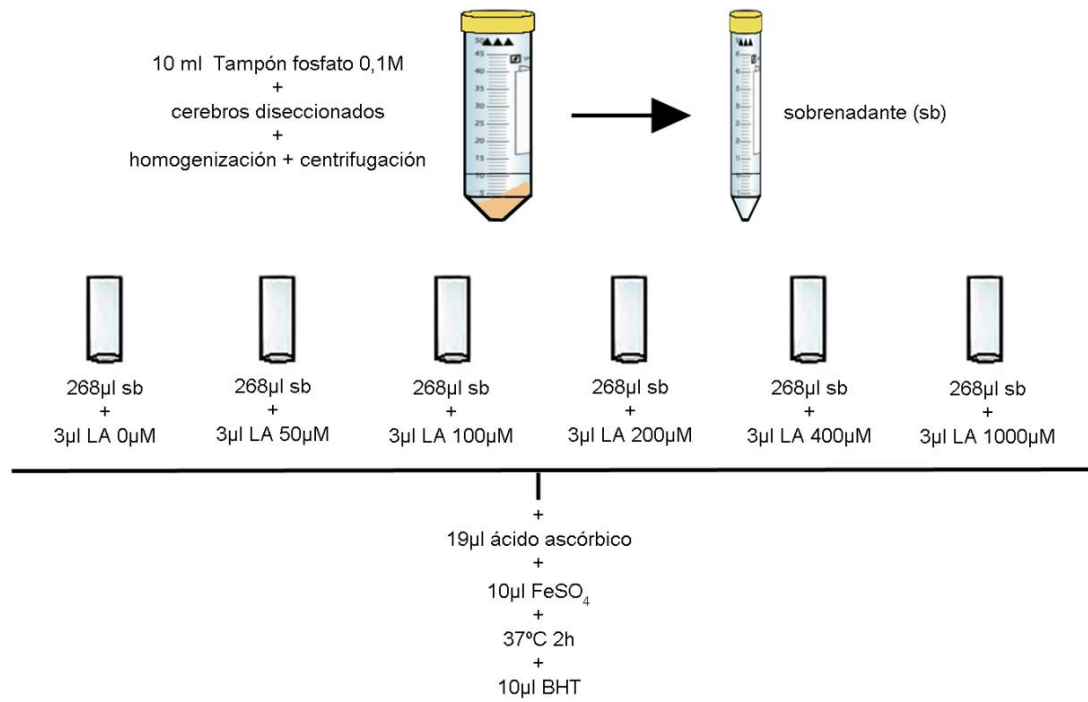


Fig.18. Desarrollo experimental del modelo de la peroxidación lipídica en homogenado de cerebro de ratón.

2.3. Estudio *in vivo*

2.3.1. Modelo de criolesión

En tercer lugar, se llevó a cabo el estudio *in vivo* del tratamiento con LA como estrategia reparativa tras el modelo de CR en la corteza cerebral. Para ello se desarrolló un modelo experimental con ratas Wistar a corto (Figura 19) y largo plazo (Figura 20) que se detalla a continuación:

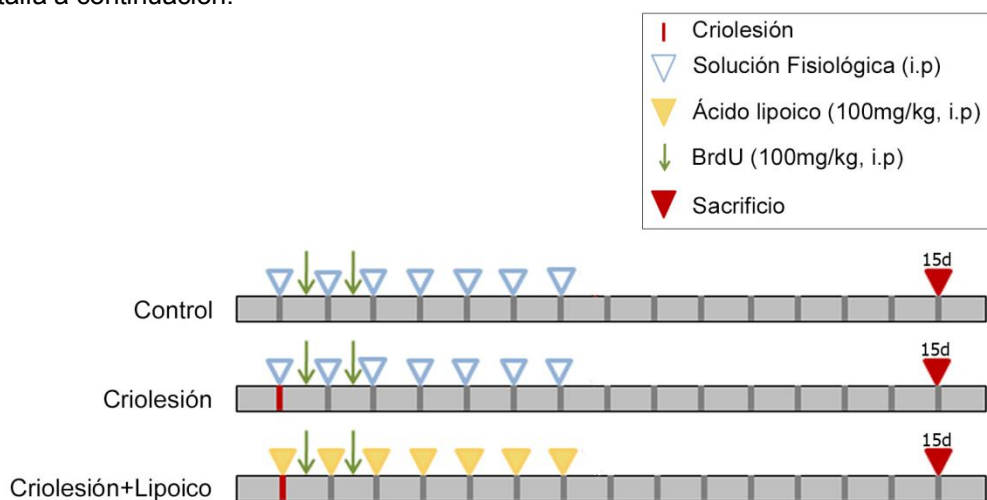


Fig.19. Desarrollo experimental del modelo de tratamiento con LA como estrategia reparativa tras CR en la corteza cerebral a corto plazo (15 días). BrdU: bromodesoxiuridina, i.p: intraperitoneal, 15d: 15 días.

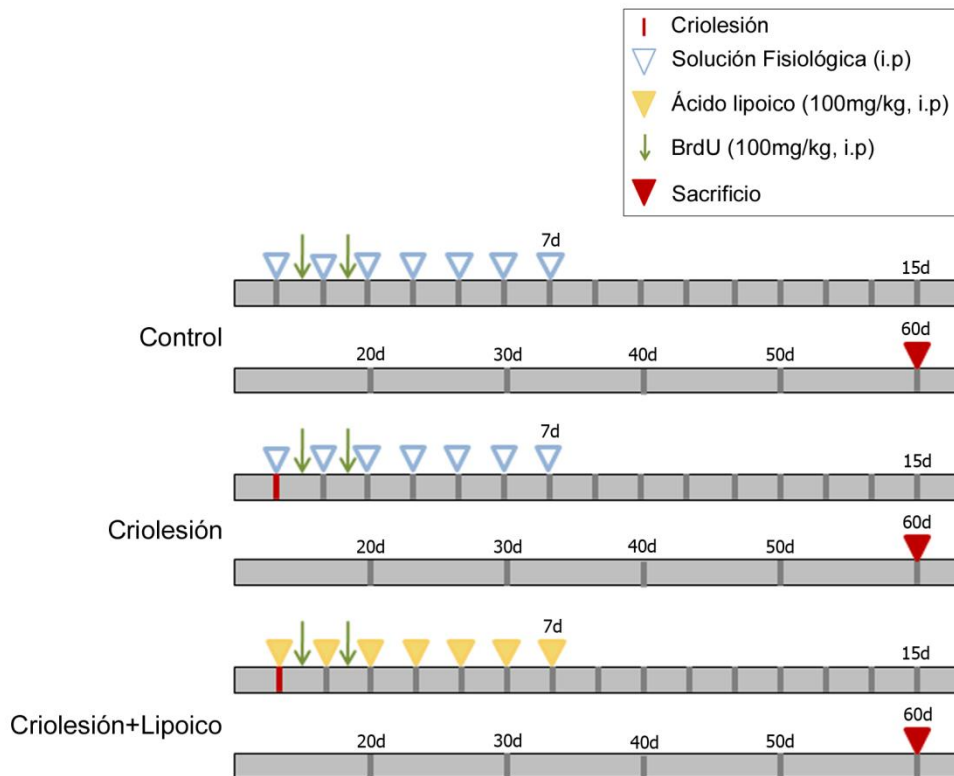


Fig.20. Desarrollo experimental del modelo de tratamiento con LA como estrategia reparativa tras CR en la corteza cerebral a largo plazo (60 días). BrdU: bromodesoxiuridina, i.p: intraperitoneal, 7d: 7 días, 15d: 15 días, 20d: 20 días, 30d: 30 días, 40d: 40 días, 50d: 50 días y 60d: 60 días.

Para llevar a cabo la lesión en la corteza cerebral se realizó la técnica de CR adaptada del protocolo de Quintana y colaboradores, (Quintana et al., 2007). El animal se anestesió mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (12mg/Kg) (Imalgene, Leonvet, León, España) y acepromacina (0,4mg/Kg) (Calmo Neosan, Pfizer, Madrid, España). Siendo la ketamina un anestésico y la acepromacina un tranquilizante/sedante. El animal se colocó en posición de decúbito prono en el estereotáxico (Digital Lab Standard Stereotaxic Stoelting Co, Wood Dale, USA) utilizando soportes tanto intraauriculares como para el maxilar superior, con el fin de mantener el cráneo sujeto.

Se rasuró con una máquina eléctrica la zona a intervenir, cubriendo toda el área con una solución de povidona yodada al 10 %. A continuación, se realizó una incisión longitudinal en la línea media de la cabeza, se separó la piel, exponiéndose así el cráneo y con ayuda del bisturí se fue limpiando toda esta zona hasta observar el punto de referencia Bregma. Tomando Bregma como punto de referencia (0,0) y con la ayuda de un taladro quirúrgico se realizó una craneotomía de 2 mm de diámetro, profundizando hasta alcanzar la duramadre pero sin llegar a perforarla, en el punto (0, 1,5 mm) siguiendo las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (Figura 21 A) (Paxinos and Watson, 1986). A continuación, se empleó un estilete de acero inoxidable (1 mm \varnothing), previamente sumergido en nitrógeno líquido (-183 °C), que se insertó hasta una profundidad de 1 mm y se mantuvo durante 20 segundos, con el objetivo de lesionar la corteza cerebral (Figura 21 B).

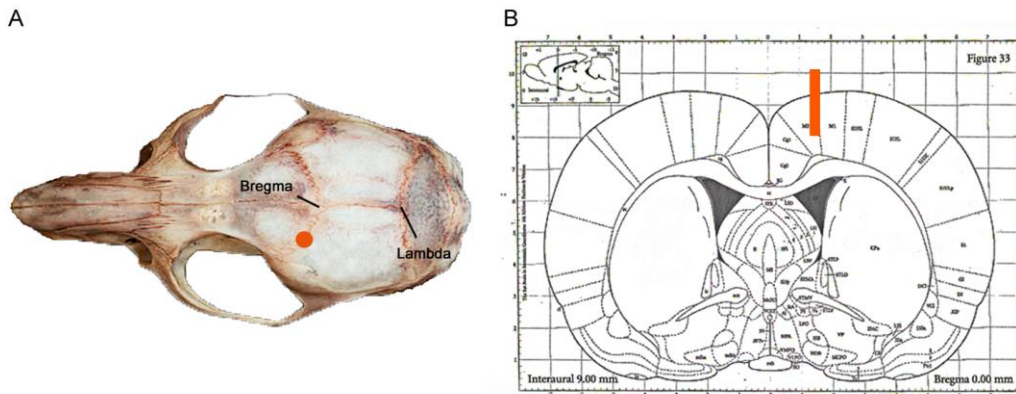


Fig.21. Posición de la criolesión en rata. (A) Se muestra una imagen superior del cráneo de una rata, el punto naranja indica donde se realizó la trepanación y posterior CR. (B) Lámina de un corte coronal a la altura de bregma indicando la posición y extensión de la CR. Adaptado de (Paxinos and Watson, 1986, Cervantes, 2015)

Al acabar el procedimiento, se suturó la piel y se le administró los analgésicos buprenorfina (0,015 mg/kg) y metamizol (20 mg/kg) en el postoperatorio.

Por último lugar, se realizó el estudio *in vivo* del efecto del trasplante de BMDC tras el modelo de CR, comparando sus efectos con los observados tras el tratamiento con LA y realizando la evaluación del posible efecto sinérgico aplicando ambos tratamientos (Figura 22). Para ello se desarrolló un modelo experimental con ratones CD1 y GFP⁺/CD1 que se detalla a continuación:

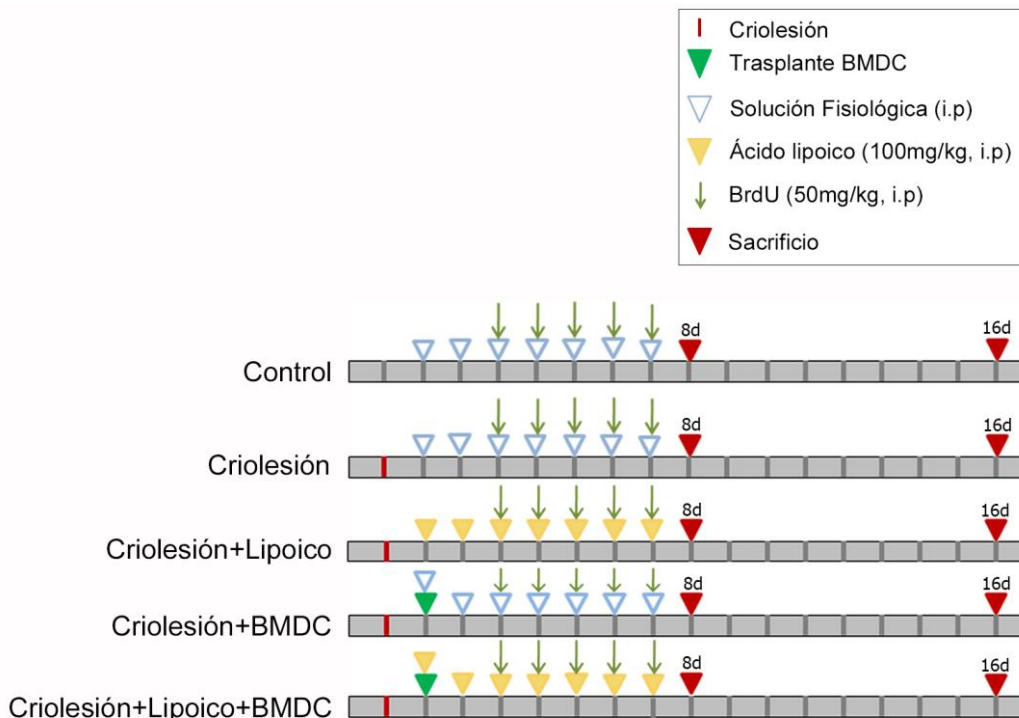


Fig.22. Desarrollo experimental del modelo de trasplante de BMDC y tratamiento con LA como estrategia reparativa tras CR en la corteza cerebral. BrdU: bromodesoxiuridina, i.p: intraperitoneal, 8d: 8 días, 16d: 16 días.

En este estudio se realizó el procedimiento descrito anteriormente con el fin de llevar a cabo la CR, pero esta vez se utilizó un modelo animal de ratón CD1 y por tanto cambiaron las coordenadas usadas para la CR. Los animales se colocaron en posición de decúbito prono en el estereotáxico (Digital Lab Standard Stereotaxic Stoelting Co, Wood Dale, USA) utilizando soportes tanto intraauriculares, como para el maxilar superior con el fin de mantener el cráneo sujeto. La CR se llevó a cabo a través del cortex fronto-parietal derecho, siguiendo el protocolo de Quintana y colaboradores.(Quintana et al., 2007) y usando las coordenadas desde bregma (L: +1,5mm; A:-0,1mm; D:-1,5mm) de acuerdo con el atlas de cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (Figura 23) (Paxinos and Franklin, 2004).

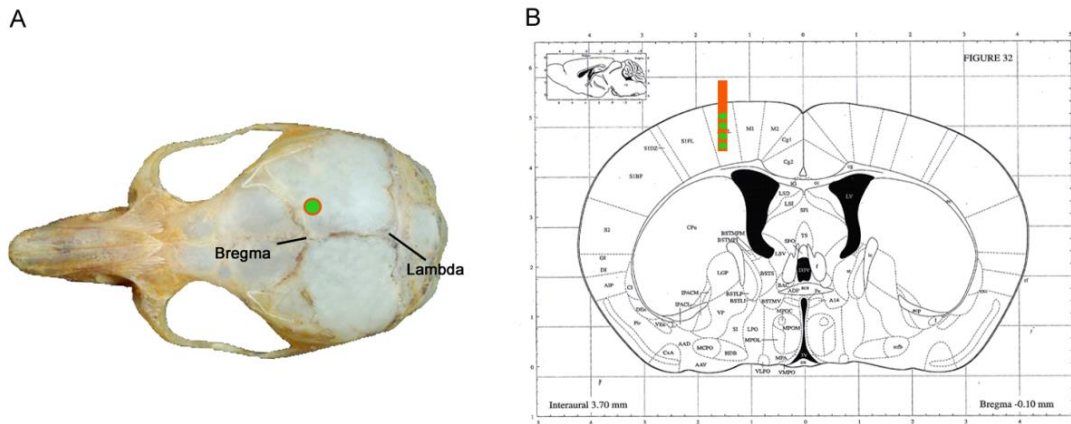


Fig.23. Posición de la criolesión en ratón. (A) Se muestra una imagen superior del cráneo de un ratón, el punto naranja indica donde se realizó la trepanación y posterior CR. El punto verde indica el sitio de trasplante de las BMDC. (B) Lámina de un corte coronal a la altura de bregma indicando en naranja la posición y extensión de la CR y en verde los cuatro puntos de profundidad donde se liberaron las BMDC. Adaptado de (Paxinos and Franklin, 2004, Cervantes, 2010).

2.3.2. Administración de ácido lipoico

El tratamiento antioxidante aplicado fue una solución de LA, disuelta en suero fisiológico (NaCl 0,9 %) a pH 7,4. Este se administró por vía intraperitoneal una vez al día, durante 7 días consecutivos, comenzando en el caso del modelo de tratamiento con LA tras CR a corto y largo plazo *in vivo*, el mismo día que se realizó la lesión (Figuras 19 y 20) y empezando un día tras la lesión en el caso del modelo de tratamiento con LA y BMDC tras CR *in vivo* (Figura 22). Por otra parte, al grupo experimental criolesionado no tratado con LA, se le administró el mismo volumen de una solución de suero fisiológico. Finalmente, a otro grupo de animales se les realizó la craneotomía, pero los animales no fueron criolesionados y se les administró el mismo volumen de solución de suero fisiológico. Este grupo fue considerado como grupo control.

Además, con el objetivo de realizar un estudio sobre la proliferación celular se procedió a la administración de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU).

2.3.3. Administración de bromodesoxiuridina

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

El estudio de la proliferación celular se llevó a cabo de la siguiente manera:

En el caso del modelo de tratamiento con LA tras CR a corto y largo plazo *in vivo*, a los animales se les administró por vía intraperitoneal una dosis diaria (100 mg/kg) de una solución de BrdU (Sigma Aldrich, España) disuelto en tampón Tris 0,1 M a pH 7,4, los dos primeros días tras la operación (Figuras 19 y 20). Por otra parte, en el caso del modelo de tratamiento con LA y BMDC tras CR *in vivo*, a los animales se les administró por vía intraperitoneal una dosis diaria (50 mg/Kg) de una solución de BrdU disuelto en tampón Tris 0,1M a pH 7,4 durante cinco días consecutivos empezando el tercer día tras la operación (Figura 22).

En el diseño experimental del tratamiento con LA tras CR realizado a corto plazo, los animales fueron sacrificados a los 15 días para determinaciones inmunohistoquímicas (n=6 para cada uno de los grupos) y microscopía electrónica (n=4 para los grupos de CR y CR+LA) (Figura 19). En el caso del diseño experimental realizado a largo plazo, los animales fueron sacrificados a los 60 días para determinaciones inmunohistoquímicas (n=6 para cada uno de los grupos) (Figura 20). Por último, en el modelo de tratamiento con LA y BMDC tras CR, los animales fueron sacrificados a los 8 días de la operación para realizar determinaciones bioquímicas (n=4 para cada uno de los grupos) e inmunohistoquímicas (n=5, para cada uno de los grupos), y a los 16 días para determinaciones inmunohistoquímicas (n=5 para cada uno de los grupos) (Figura 22). De manera adicional, dos animales del grupo CR+BMDC y dos animales del grupo CR+BMDC+LA fueron sacrificados a los 6 días de la operación para detectar la presencia de células trasplantadas en este punto.

2.3.4. Extracción de células derivadas de la médula ósea

Tras 24 horas de la CR, se realizó la extracción de las BMDC. Dos ratones GFP⁺ se sacrificaron por dislocación cervical. Sus huesos fémur, tibia y los huesos de la cadera se extrajeron en un ambiente aséptico y se realizó la rotura del extremo superior e inferior de los huesos con la ayuda de unas pinzas, dejando expuesto el canal medular. Rápidamente, mediante una jeringa se lavó la cavidad medular con PBS 0,1 M a pH 7,2. La suspensión celular obtenida se pasó a través de un filtro de nylon de 50 µm, eliminando así las fibras y restos de tejido. La médula así obtenida se lavó con PBS y se procedió al lisado de los eritrocitos por choque osmótico con cloruro amónico a temperatura ambiente (RT; room temperature). Finalmente, se centrifugó para resuspenderla a una densidad de $10\text{-}5 \times 10^6$ células/µL. Las células así preparadas estaban listas para ser trasplantadas (Figura 22).

2.3.5. Inyección/trasplante intracerebral de células derivadas de la médula ósea

La suspensión concentrada de BMDC ($10\text{-}5 \times 10^6$ células/ μL) se cargó en una aguja Hamilton adaptada a un microinyector y se administró intracranealmente a una velocidad de $0,84 \mu\text{l}/\text{min}$ con la ayuda del estereotáxico. El volumen de suspensión celular ($0,14 \mu\text{L}$) se liberó en cuatro diferentes puntos a lo largo del eje dorsal (D: $-1,4/-1,2/-1,0/-0,8$). Además, para dar tiempo a las células a asentarse, tras cada inyección se esperaron 2 min y posteriormente se extrajo el inyector suavemente, minimizando así la pérdida de células del sitio de inyección.

Por lo tanto, las células fueron dispersadas en cuatro diferentes profundidades permitiendo una distribución más uniforme en el parénquima cerebral y evitando tanto un daño secundario no específico, debido a una gran acumulación de células en un único punto, así como el desgarro del tejido debido al volumen de inyección.

3. Obtención y procesado de muestras

3.1. Obtención de muestras para determinaciones bioquímicas

Para la obtención de las muestras de los cultivos de la corteza cerebral destinadas a las determinaciones de GSG, GSSG y glutámico, se recolectaron las células de los 9 pocillos de cada uno de los grupos de estudio. Se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min y tras quitar el sobrenadante, el pellet celular se conservó a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

Del mismo modo, las muestras obtenidas del tratamiento de LA en un estrés oxidativo *ex vivo* provocado mediante la estimulación de la peroxidación lipídica a partir de sales de Fe (II) y ácido ascórbico, se congelaron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta que se realizó el análisis de GSH, GSSG y glutamato mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC; high pressure liquid chromatography). Así como el análisis de MDA también mediante HPLC.

Para la obtención de las muestras de los estudios realizados *in vivo* mediante CR que se destinaron a determinaciones bioquímicas, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, se extrajo el cerebro y se realizó la disección de la zona lesionada con la ayuda de un sacabocados (2 mm de diámetro interno). Este material se conservó a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización.

3.2. Obtención de muestras para determinaciones inmunohistoquímicas

3.2.1. Perfusión con paraformaldehído al 4 %

La fijación tiene como principal objetivo la interrupción de los procesos de degradación que aparecen tras la muerte celular, asegurando la máxima conservación de las estructuras tisulares y celulares y de las características químicas del tejido. No existe un método de fijación ideal, por lo cual debe adecuarse a cada tejido y/o estudio. En este estudio se optó por el proceso de perfusión transcardíaca y para ello se empleó una solución de paraformaldehído (PFA, J.T.Baker, Deventer, Holanda) al 4 % en suero fisiológico salino (NaCl 0,9 %) y pH 7,5,

que proporciona una fijación uniforme de alta calidad y que conserva la estructura celular y tisular a gran escala en el SNC.

Los animales fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital sódico que es un eutanásico (Dolethal, Vetoquinol especialidades veterinarias, S.A., Madrid, España). Antes de comenzar la perfusión se lavó la bomba de perfusión (Minipuls 3 Gilson, Villiers, Francia) con solución salina y se purgó para eliminar las burbujas. A continuación, alcanzado el plano quirúrgico (ausencia del reflejo podal) se colocó el animal en posición de decúbito supino en un bloque y se inmovilizó. Se realizó un corte sobre el esternón lo suficientemente largo para exponer el final del esternón. Se pinzó el mismo, se cortó el diafragma y se realizaron ambos cortes laterales en las costillas. Así pues, se agarró el final del esternón y se estiró hacia la cabeza para exponer el corazón. A partir de este momento el animal ya no puede respirar pero el corazón sigue funcionando por un corto periodo de tiempo. Es importante empezar el proceso de fijación antes de la abolición del latido cardíaco, a raíz del cual empezaría el proceso de coagulación. Por tanto, rápidamente se introdujo una cánula dentro del corazón, entrando por el ventrículo izquierdo. Posteriormente, se encendió la bomba y rápidamente con unas tijeras de microdissección se realizó una pequeña incisión en la aurícula derecha para evitar el exceso de presión en el corazón y facilitar la circulación de retorno. Se lavó el sistema con salino durante 10 min para el caso de las ratas y durante 3 minutos para el caso de los ratones. Finalmente, se hizo fluir de modo continuo e ininterrumpido la solución fijadora de PFA al 4 % y se mantuvo durante 15-20 min en el caso de las ratas y durante 10-15 min en el caso de los ratones. Una vigorosa contracción muscular es indicativa de la correcta fijación animal. Una vez perfundido el animal, se decapitó a nivel de las orejas y se extrajo el cerebro completo sin diseccionarlo. Las muestras se colocaron durante 24 h en la misma solución fijadora de PFA al 4 % a 4 °C para una postfijación adicional por inmersión. Posteriormente, en el caso de los cerebros de rata del modelo de tratamiento con LA tras CR a corto y largo plazo *in vivo*, se cambiaron a una solución de sacarosa al 30 % entre 24-48 h a 4 °C y se incluyeron en OCT, (Sakura, Torrance, USA) para poder ser cortadas a 20 µm en el criostato (Leica, Heidelberg, Germany). Los cortes fueron guardados a -80 °C hasta su utilización. Por otra parte, en el caso de los cerebros de ratón del modelo de tratamiento con LA y BMDC tras CR *in vivo*, se conservaron en tampón fosfato 0,1 M, a pH 7,4 (PB; phosphate buffer) con azida sódica al 0,05 % y 4 °C hasta que se cortaron a 50 µm en el vibratomo (Leica, Saint Louis, USA).

3.3. Obtención de muestras para microscopía electrónica

Parte de los animales de los grupos CR y CR+LA del modelo de tratamiento con LA tras CR a corto plazo *in vivo* fueron perfundidos con 100 ml de una solución de NaCl al 0,9 % y 200 mL de PFA al 2 % más glutaraldehído al 2,5 % (EMS, Hatfield, USA) disuelto en PB 0,1 M a pH 7,4, para el estudio de microscopía electrónica. Una vez perfundidos, los cerebros fueron extraídos y postfijados a 4 °C con la misma solución de fijación toda la noche (ON; overnight). Los cerebros fueron entonces cortados con vibratomo a 200 µm. Las secciones fueron postfijadas con tetraóxido de osmio al 1 % y glucosa al 7 % durante 1 h a RT, lavadas 3 veces con ácido málico e incubadas con acetato de uranilo durante 1 h (2 % en ácido málico). Las

secciones fueron lavadas con ácido málico y deshidratadas con soluciones crecientes de alcoholes (30°, 60°, 90°, 100°). Luego, se lavaron durante 2 min en oxido de propileno y se embebieron en Durcupan (Fulka, Sigma Aldrich, St. Louise, USA). A partir de este momento el procesado de las muestra se llevó a cabo según el protocolo de Doetsch y colaboradores (Doetsch et al., 1997).

4. Procedimientos y técnicas

4.1. Estudio *in vitro*

4.1.1. Determinación de la viabilidad celular mediante MTT

Al finalizar el tratamiento respectivo a cada uno de los grupos que hemos detallado previamente en el apartado 2.1.1.3. de material y métodos, se llevó a cabo la técnica de MTT (Sigma Aldrich, Milán, Italia) para determinar la viabilidad celular mediante el siguiente protocolo:

1. Se cambió el medio de los pocillos por medio nuevo (10 % FBS-Pen/Strep-Gln).
2. Se añadieron 20 μ L de MTT a cada uno de los pocillos.
3. Se pusieron las células en el incubador durante 1 hora.
4. Se eliminó el medio y se añadieron 50 μ L de DMSO (Sigma Aldrich, Milán, Italia) para lisar las células.
5. Tras 15 min se leyó la placa al espectrofotómetro (Genesys 20, Thermo Scientific, Waltham, USA) ($\lambda=550\text{nm}$).

Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células vivas en un compuesto coloreado azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazan producido y cuantificado mediante un espectrofotómetro (Park et al., 2010).

4.1.2. Determinación de la viabilidad celular mediante inmunofluorescencia de yoduro de propidio/hoechst

Por otra parte, al finalizar el tratamiento respectivo a cada uno de los grupos mencionados en el apartado 2.1.1.3. de material y métodos, se llevó a cabo una inmunofluorescencia de yoduro de propidio/Hoechst (PI; propidium iodide) (Sigma Aldrich, Milán, Italia) mediante el siguiente protocolo:

1. Se añadió a cada pocillo el medio (10 % FBS-Pen/Strep-Gln) con el PI (3 mL de medio + 15 μ L de PI)
2. Se incubó 20 min a RT
3. Se añadió 2 μ L de Hoechst en cada pocillo y se agitó la placa
4. Se incubó 10 minutos a RT

5. Se retiró el medio y se lavó con PBS 1X

6. Finalmente, se añadió medio a cada pocillo para realizar las fotos en el microscopio invertido de fluorescencia (Nikon) (3 fotos por pocillo).

Esta es una técnica de marcaje fluorescente para los ácidos nucleicos. De esta forma se marca la degradación del ADN justo en el momento del análisis. Cuando las células en cultivo sufren apoptosis, al no ser fagocitadas, sufren una necrosis secundaria al proceso apoptótico, por lo tanto puede incrementar el número de células que dan positivo en PI, ya que el PI es impermeable a la membrana de células no dañadas, de tal forma que permite distinguir entre células viables y muertas, puesto que sólo las muertas emitirán fluorescencia (Jung et al., 2010).

4.2. Estudio *in vitro* y *ex vivo*

4.2.1. Determinaciones bioquímicas

4.2.1.1. Determinación de proteínas (Método de Lowry)

El método consiste en la realización de una curva patrón de concentraciones crecientes de albúmina de suero bovino (BSA; bovine serum albumin). Tras la adición de las soluciones de trabajo y del reactivo de Folin, se mide la absorbancia de cada uno de los tubos de ensayo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 696 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración de proteínas, por tanto, con los valores de absorbancia obtenidos para los distintos estándares se obtiene la recta patrón y por interpolación se cuantifican las concentraciones de proteínas de las muestras que están siendo analizadas.

La determinación se realizó según el procedimiento descrito por Lowry y colaboradores (Lowry et al., 1951) con las modificaciones que a continuación se detallan.

Las soluciones que se utilizaron fueron:

- Solución 1: Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich, Madrid, España) al 4 % + NaOH (Sigma-Aldrich, Madrid, España) al 0,8 %, en 1 litro de agua bidestilada.

- Solución 2a: CuSO_4 (Guinama, Valencia, España) a 1,25 mM, en 1 litro de agua bidestilada.

- Solución 2b: $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a 1,42 mM, en 1 litro de agua bidestilada.

Las soluciones 1, 2a y 2b se conservaron a 4 °C hasta su utilización.

- Solución 3: Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, Madrid, España) diluido a 1 N.

- Solución 4: Estándar de 1 mg/ml de BSA (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Las soluciones 1, 2 y 3 se prepararon en el momento previo a su uso:

Solución 1+2 = solución 1: solución 2a: solución 2b (2:1:1).

Solución 3 diluida 1:2 con agua bidestilada

Para llevar a cabo el procedimiento primero se prepararon tubos de ensayo de la curva patrón con cantidades diferentes de la solución 4 (0, 10, 25, 50, 75 y 100 μL) y se añadió agua bidestilada hasta un volumen de 200 μL . Los tubos de ensayo donde se añadieron las

muestras contenían 25 µL de muestra y 175 µL de agua bidestilada. Tanto la curva patrón como las muestras se hicieron por duplicado. Posteriormente, a cada tubo de ensayo se le añadió 1 ml de la solución 1+2. Se dejó reaccionar durante 10 min a RT y en oscuridad, tras lo cual se añadieron 100 µL de la solución 3 a cada uno de los tubos. Se agitó bien y se esperó durante 20 min a RT y en oscuridad. Pasado este tiempo se midió la absorbancia de cada uno de los tubos de ensayo en el espectrofotómetro (Genesys 20, Thermo Scientific, Waltham, USA) a una longitud de onda de 696 nm. La absorbancia a 696 nm es directamente proporcional a la concentración de proteínas.

4.2.1.2. Determinación de las concentraciones de glutatión, glutatión disulfuro y glutamato.

La concentración de GSH en las distintas muestras se determinó por el procedimiento descrito por Reed y colaboradores (Reed et al., 1980). El método se basa en la reacción del ácido iodoacético con los grupos tioles para formar derivados carboximetilos seguido de una derivatización cromófora de los grupos amino con el reactivo de Sanger o 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (DNFB) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) dando lugar a derivados 2,4-dinitrofenil (DNP; 2,4-dinitrophenyl). Estos derivados son rápidamente separados por HPLC; lo que permite la cuantificación de niveles nanomolares de GSH, GSSG y aminoácidos relacionados. Los valores de glutamato, GSH y GSSG se refirieron a los niveles de proteínas determinadas por el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

Se empleó un equipo de HPLC (Gilson, Middleton, USA) que consta de los siguientes componentes:

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

La columna para la determinación cromatográfica fue una Kromasil Amino 5 µm, de 250 x 4,6 mm (Análisis Vínicos, Barcelona, España). Las condiciones iniciales del flujo fueron de 1 mL/min, 80 % de la fase móvil A y 20 % de la fase móvil B. Estas condiciones iniciales se mantuvieron durante 10 min, seguidas de un gradiente lineal hasta el 95 % de la fase móvil B durante 40 min y reequilibrado con las condiciones iniciales durante 10 min previos al análisis de la siguiente muestra. La longitud de onda utilizada fue de 365 nm. El rango del detector ultravioleta empleado fue 0,005 y el tiempo de respuesta de 5 segundos. La inyección de cada muestra se realizó automáticamente con un autoinyector con capacidad para 45 muestras.

La fase móvil A se preparó con metanol HPLC (J.T. Baker, Deventer, Holanda) al 80 % en agua HPLC y la fase móvil B se preparó con acetato sódico (Sigma-Aldrich, Madrid, España) 5 M en ácido acético glacial (J.T. Baker, Deventer, Holanda) más agua HPLC. Una vez disuelto se diluyó en 80 % de fase A. Posteriormente, se filtraron a través de un filtro-membrana de celulosa de 0,2 μm (Sartorius stedim biotech, Madrid, España). La solución madre de calibración se preparó diariamente y se conservó en nevera a 4 °C. Dicha solución madre consistió en una concentración de 10 mM de glutamato, GSH y GSSG reducido en agua ultrapura.

La solución 1 es una preparación de ácido iodoacético 100 mM (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y m-cresol 0,2 mM (Acros Organics, New Jersey, EE.UU). Esta solución permanece estable dos semanas tras su preparación y se mantiene a 4 °C protegida de la luz. La solución 2 es una preparación de 10 M de KOH (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y 3 M de KHCO_3 (Sigma-Aldrich, Madrid, España), solución estable a 4 °C. La solución 3 es una preparación de DNFB al 15 % v/v en etanol absoluto HPLC (J.T. Baker, Deventer, Holanda). Este se preparó fresco cada día y se conservó a 4 °C protegido de la luz.

Para cada una de las determinaciones en tubos de 1,5 mL se prepararon un blanco y una curva de calibración de estándares: 0–20–40–60–80 y 100 μM para las dos formas del glutatión; GSH (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y GSSG (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y de 0–200–400–600–800 y 1000 μM para el glutamato (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Posteriormente, en tubos de 1,5 mL se añadieron 20 μL de la solución 1 a 100 μL de muestra y de los estándares, previamente acidificados y congelados. El pH se ajustó a 8,5–9 al añadir 30 μL de la solución 2, tras este paso se incubaron los tubos 30 min en oscuridad a RT. Finalmente, se añadieron 100 μL de la solución 3 para formar los derivados DNP, que requieren de un mínimo de 4 horas a 4 °C en oscuridad para formarse.

En caso de que las muestras no se vayan a analizar tras un tiempo de incubación de 24 horas a 4 °C, las muestras se almacenan a -20 °C durante un máximo de 20 días.

Tras el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se utilizó para su análisis en el equipo de HPLC. La cantidad mínima de muestra inyectada fue de 115 μL para tener la seguridad de llenar el bucle de 100 μL .

4.3. Estudio *ex vivo*

4.3.1. Determinaciones bioquímicas

4.3.1.1. Determinación de la concentración de Malondialdehído

Para la cuantificación del malondialdehído (MDA) de las muestras de homogenado de cerebro tras el ensayo de peroxidación lipídica, utilizó una modificación del método de Richard y colaboradores (Richard et al., 1992), en el cual se determina el nivel del complejo formado entre el MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA; thiobarbituric acid) en base a la reacción de dos moléculas de TBA con una de MDA.

Para la determinación de la concentración de MDA se empleó el siguiente equipamiento:

- Bombas cromatográficas: *Waters 1525 binary HPLC Pump*
- Detector de fluorescencia: *Waters 2475 Multi λ fluorescence*
- Inyector: *Waters 717 plus Autosampler* con bucle de 50 μ L
- Controlador *Multiport* modelo RS.232.
- Ordenador: *IBM Windows*
- Programa informático: *Data System MT2*

La columna empleada para la determinación cromatográfica fue la Kromasil C18 Amino 5 μ m, 250 x 4,6 mm (Análisis Vínicos, Barcelona, España). Las condiciones del flujo fueron de 1,0 ml/min. La longitud de onda de excitación fue de 532 nm y la de emisión de 553 nm. El voltaje del detector de fluorescencia empleado fue de 600 voltios y la respuesta de 2 segundos. La inyección de cada muestra se realizó manualmente con una jeringuilla de 100 μ L tipo Hamilton (Reno, Nevada)

La preparación de las soluciones empleadas se realizó del modo siguiente:

La fase móvil se prepara con tampón fosfato 50 mM a pH 6 y metanol (mezclados en proporción 580 mL de tampón y 420 mL de metanol). Posteriormente, la fase móvil se filtra a través de un filtro-membrana de celulosa de 0,2 μ m. (Sartorius stedim biotech, Madrid, España).

La solución madre de calibración se prepara previo a su uso y se conserva a 4 °C. Dicha solución madre consiste de 20 mM de 1, 1, 3, 3-tetraetoxipropano (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en etanol absoluto HPLC.

La solución de trabajo consiste en una preparación de TBA (Sigma-Aldrich, Madrid, España) al 0,37 % y ácido perclórico (Panreac, Barcelona, España) al 6,4 %, 2:1 v/v respectivamente. La solución de trabajo también se prepara de forma diaria previamente a su uso.

El procedimiento experimental seguido fue el siguiente:

Para la determinación del MDA se prepararon en tubos de 1,5 mL un blanco y una curva de calibración de estándares: 0-0,2-0,4-0,5-1-1,5 y 2 μ M. Se tomaron 100 μ L de los patrones y de las muestras y se mezclaron bien con 75 μ L de la solución de trabajo en tubos de 2 mL. A continuación, se incubaron los tubos sellados con teflón en un baño con agua a 95 °C. Para detener la reacción se enfriaron los tubos 10 min en un baño con hielo (se mantendrán en hielo hasta el siguiente paso). Posteriormente, se centrifugaron las muestras 10 minutos a 12.000 rpm a 4 °C. El aducto MDA-TBA es inestable a pH neutro, por ello cada muestra y patrón se neutraliza 10 min antes de cada inyección.

De este modo, se neutralizó el sobrenadante obtenido en el paso anterior con hidróxido potásico a 0,7 M (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se neutralizó hasta obtener un pH de 6, esto se comprueba aplicando unos microlitros de muestra en tiras de papel indicadoras de pH universal pH 1-11 (Macherey-Nagel, Hoerd, Francia). Una vez se ajustó el pH se centrifugaron las muestras durante 1 min a 12.000 rpm, con la finalidad de precipitar las sales insolubles que podrían interferir en la determinación. Finalmente, se filtraron 100 μ L de muestra con filtros de

jeringa no estériles y se inyectaron en el equipo de HPLC. La cantidad de muestra inyectada fue de aproximadamente 100 μ L para tener la seguridad de llenar el bucle de 50 μ L.

4.4. Estudio *in vivo*

4.4.1. Determinaciones bioquímicas

4.4.1.1. Determinación de proteínas (Método de Bradford)

Como se había especificado anteriormente, tras el sacrificio de los animales criolesionados y sus respectivos controles destinados a determinaciones bioquímicas, se extrajo el cerebro y se realizó la disección de la zona lesionada con la ayuda de un sacabocados, siendo los bloques extraídos de 2 mm de diámetro y 1,5 mm de profundidad y este material se conservó a -80 °C hasta su utilización para la determinación de proteínas por el método de Bradford y la metodología de western blot.

Este método se usa para cuantificar las proteínas de las muestras destinadas a western blot, y se basa en el procedimiento descrito por Bradford (Bradford, 1976).

En primer lugar se realizó una recta patrón de concentraciones conocidas (0-0,5-1-5-10-20 y 50 μ g) de la proteína BSA. Para ello se mezcló reactivo de Kit de detección "Bio-rad protein assay" (Bio-rad, Hercules, EEUU) diluido 1:5 en agua bidestilada con la cantidad de proteína correspondiente hasta 1 ml. Para cuantificar las proteínas de las muestras se añadieron 2 μ l de muestra y hasta 1 ml de reactivo de kit de detección y se esperaron 5 min para que se produjese la reacción. La absorbancia de la reacción colorimétrica se midió a 595 nm en un espectrofotómetro. Con los valores de absorbancia obtenidos se cuantificaron las concentraciones de proteínas de las muestras puesto que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de proteínas.

4.4.1.2. Electroforesis y Western blot para Caspasa 3, COL4A2, BDNF, TNF alpha y NF κ B

La metodología de western blot empleada está descrita en "Current Protocols in Protein Science" (Laki et al., 1958).

Este procedimiento consiste en la migración de proteínas del tejido fraccionado por medio de una electroforesis desnaturizante en geles de acrilamida. Estas proteínas una vez que se han separado en el gel por su tamaño, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. La presencia de las proteínas se pone de manifiesto por medio de anticuerpos específicos ligados a un sistema de detección y visualización.

El procedimiento experimental que se utilizó fue el siguiente:

1. Aislamiento de las proteínas: las muestras obtenidas de la zona criolesionada de los animales se homogenizaron en un tampón de lisis (150 mM NaCl (Sigma Aldrich, Madrid, España), 1 % Tritón (Sigma Aldrich, Madrid, España), 1 mM Ditioneitol (DTT) (Sigma Aldrich, Madrid, España), 50 mM Tris a pH 8,0 más un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche, Mannheim, Alemania) y de fosfatasa (10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ (J.T. Baker, Deventer, Holanda)) y con la ayuda mecánica de un pistilo para tubos cónicos de 1,5 mL.

Posteriormente, se incubaron durante 30 min en hielo. Tras la centrifugación de los lisados (20.800 g, 20 min) se recogió el sobrenadante para su posterior cuantificación.

2. Cuantificación de la proteínas: la cuantificación de las proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) descrito previamente en el apartado 4.4.1.2. de material y métodos.

3. Migración electroforética en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó en cubetas Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, USA) en geles del 7,5 y 11 % de poliacrilamida al 40 % (Bio-rad, Hercules, USA), cargando 60 µg de proteína total. Antes de realizar la carga, se añadió a las muestras tampón de carga 5X compuesto de 15 % sodio dodecil sulfato (SDS) (Sigma Aldrich, Madrid, España); 50 % glicerol (Sigma Aldrich, Madrid, España); 0,1 % azul de bromofenol (Sigma Aldrich, Madrid, España); 312,5 mM Tris-HCl (Sigma Aldrich, Madrid, España) a pH 6,8; 16 % β-mercapto-etanol (Sigma Aldrich, Madrid, España). Seguidamente, se calentaron a 95 °C durante 5 min y se centrifugaron 1 min a 13.000 rpm.

Para la separación por electroforesis vertical en los geles de poliacrilamida, se cargaron las muestras y se utilizó un tampón compuesto por 50 mM Tris, 27 mM glicina (Sigma Aldrich, Madrid, España) y 0,1 % SDS. La electroforesis se realizó a 200 V durante 60 min. Como patrón para identificar el peso molecular de las proteínas se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue Plus 2 Pre-stained estándar (Invitrogen, Lifetech, Madrid, España).

4. Transferencia: la transferencia se realizó en un equipo Mini Protean 3 (Bio-Rad, Hercules, USA) y a una membrana de nitrocelulosa, Amersham Hybond ECL (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España) durante 60 min a 300 mA, con un tampón compuesto por 20 % metanol, 20 mM Tris y 150 mM glicina.

Transcurrido ese tiempo, las membranas se tiñeron en una solución de rojo Ponceau (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) para comprobar la eficiencia de la transferencia. Seguidamente, las membranas se lavaron con PBS-T (PBS 0,01 M pH 7,5 + Tween-20 0,1 % (Qbio gene, Carlsbad, USA)) y se incubaron en solución de bloqueo (5 % de leche descremada en polvo en PBS-T) durante 60 min a RT y en agitación.

5. Incubación con el primer y segundo anticuerpo: a continuación las membranas se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios (Tabla 1) diluidos en PBS-BSA 3 %-azida 0,01 % ON a 4 °C en reposo.

Posteriormente, se lavaron en PBS 0,01 M a pH 7,5 durante 15 min para eliminar los restos de anticuerpo.

Anticuerpo 1º	Nombre	Dilución	Casa comercial	Referencia
Capase-3	Capase-3 (H-277) rabbit	1:1000	Santa Cruz, Dallas, USA	sc-7148
Cleaved Capase-3	Cleaved Capase-3 (Asp 175)(5A1) rabbit	1:1000	Cell signaling, Leiden, Holanda	#9664
COL4A2	COL4A2 (T-15) rabbit	1:200	Santa Cruz, Dallas, USA	sc-70246
BDNF	BDNF (N-20) rabbit	1:1000	Santa Cruz, Dallas, USA	sc-546
TNF α	TNF α (52B83) mouse	1:200	Santa Cruz, Dallas, USA	sc-52746
NF κ B	NF κ B p65 (C-20) rabbit	1:500	Santa Cruz, Dallas, USA	sc-372
Actina	anti- β -Actin-Peroxidase mouse	1:25000	Sigma Aldrich, Madrid, España	A3854

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios utilizados para WB. Se detallan su nombre comercial y completo, la dilución a la que se ha usado, su casa comercial y su referencia del catálogo.

Tras estos lavados, las membranas se incubaron durante 60 min con los correspondientes anticuerpos secundarios (Tabla 2) diluidos en solución de bloqueo y unidos a peroxidasa de rábano (HRP; horseradish peroxidase) y se volvieron a realizar dos lavados de 10 min cada uno con PBS-T y un último lavado de PBS 0,01 M a pH 7,5 durante 10 min.

Anticuerpo 2º	Nombre	Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti-mouse	Anti- mouse IgG-HRP (Fc)	1:5000	Thermoscientific, Waltham, USA	31437
Anti-rabbit	Anti- rabbit IgG-HRP (Fc)	1:5000	Santa Cruz, Dallas, USA	sc-3837

Tabla 2. Lista de anticuerpos secundarios utilizados para WB. Se detallan su nombre comercial y completo, la dilución a la que se ha usado, su casa comercial y su referencia del catálogo.

La detección de las proteínas se hizo mediante quimioluminiscencia empleando el kit ECL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Las membranas fueron analizadas con un lector de imágenes por quimioluminiscencia con la ayuda del equipo ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Barcelona, España) y el programa informático de análisis de imagen ImageQuant TL (GE Healthcare, Barcelona, España).

4.4.2. Tinción de hematoxilina-eosina

El fundamento de cualquier método de tinción radica en la propiedad que poseen todos los tejidos para incorporar y fijar, de manera variable, diversas sustancias capaces de teñir llamadas colorantes.

Para el estudio histológico macro y microscópico se realizó la tinción de hematoxilina-eosina (HE). En esta tinción se usan dos colorantes, el colorante básico, la hematoxilina, que tiñe las estructuras ácidas como la cromatina de color azul púrpuro, y la eosina que al ser ácida tiñe estructuras básicas como las proteínas citoplasmáticas de color rosáceo.

Para ello, se hidrataron las muestras con alcoholes de graduaciones decrecientes, se sumergieron en agua y se incubaron en hematoxilina de Harris (Sigma Aldrich, Madrid, España) durante 5 min. Seguidamente, se pasaron 5 segundos por etanol clorhídrico y se lavaron con agua. Por último, se incubaron en eosina (Sigma Aldrich, Madrid, España) al 2 % durante 2 min, se deshidrataron y se fijaron los cubreobjetos con medio de montaje Eukitt (Sigma Aldrich, Madrid, España).

4.4.3. Determinaciones inmunohistoquímicas

Las técnicas de inmunohistoquímica consisten en la identificación *in situ* de un constituyente celular o tisular mediante la interacción específica antígeno-anticuerpo, que es identificada por medio de un marcador visible.

Los anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de detección inmunohistoquímica se detallan en la tabla 3 y los anticuerpos secundarios en la tabla 4 (Tablas 3 y 4).

4.4.3.1. Técnica de inmunoperoxidasa

La inmunohistoquímica por actividad peroxidásica se basa en revelar el antígeno de interés por una reacción enzimática conjugada al anticuerpo primario o secundario, que hace precipitar un cromóforo que puede visualizarse al microscopio óptico con la luz transmitida.

4.4.3.1.1. Inmunohistoquímica para BrdU

Una vez seleccionados los cortes, se realizaron lavados con PBS 0,01 M a pH 7,5. Antes de llevar a cabo la unión del anticuerpo es necesario hacer accesible el ADN al anticuerpo primario. Para ello se llevó a cabo un desenmascaramiento:

Las muestras se introdujeron en un baño de PBS-Tritón + Metanol 10 % durante 20 min, a RT y en agitación. A continuación, los cortes se introdujeron en un baño con tampón citrato 10 mM a pH 8 hirviendo y se mantuvieron en agitación durante 30 min a RT. Seguidamente, los portas se colocaron en HCl 2 N durante 30 min a 37 °C. Además, el HCl se atemperó previamente a 37 °C. Luego, los portas se colocaron en un baño de tampón borato 0,1 M a pH 8,5 durante 10 min a RT y en agitación, tras lo cual se realizaron lavados con PBS 0,01 M a pH 7,5.

Tras el desenmascaramiento, se procedió a realizar el bloqueo de la peroxidasa endógena para evitar la reactividad propia del tejido. Para ello se incubaron los portas con una solución de H₂O₂ al 3 % en PBS-Tritón 0,1 % + 10 % metanol durante 15 min, a RT y en

Material y métodos

oscuridad. Seguidamente, se realizó el bloqueo de la reacción de fondo inespecífica, poniendo los cortes 60 min a RT en solución conocida como tampón de bloqueo (TB), formada por FBS al 20 % en PBS–Tritón 0,1 %. Además, se recurre al uso del tritón como detergente con el fin de permeabilizar la membrana y facilitar la penetración del anticuerpo para que alcance los antígenos que se quieren detectar.

A continuación, se diluyó el anticuerpo primario rata anti BrdU (1:200; Abcam, Cambridge, UK) en el TB y se incubaron los cortes con esta solución ON y en oscuridad a 4 °C en una cámara húmeda (Tabla 3).

Anticuerpo 1º	Nombre	Marcaje	Dilución	Casa comercial	Referencia
BrdU	Rat anti-BrdU	Proliferación	1:200	Abcam, Cambridge, UK	ab6326
Iba 1	Rabbit anti-ionized calcium binding adapter molecule 1	Microglía	1:200	Wako, Osaka, Japón	019-19741
GFAP	Rabbit anti-gial fibrillar acidic protein	Astroцитos	1:500	Dako, Glostrup, Dinamarca	Z0334
Collagen IV	Rabbit anti-Collagen IV	Colágeno vasos sanguíneos	1:200	Abcam, Cambridge, UK	ab6586
ED1	Mouse anti-macrophages/monocytes antibody, clone ED-1	Macrófago	1:200	Merck Millipore, Temecula, USA	MAB1435
MAP2	Mouse anti-MAP2 alexa fluor 488 conjugated	Neuronas maduras	1:150	Merck Millipore, Temecula, USA	MAB3418X

Tabla 3. Lista de anticuerpos primarios utilizados para técnicas de inmunohistoquímica. Se detallan su nombre comercial y completo, el marcaje, la dilución a la que se ha usado, su casa comercial y su referencia del catálogo.

Al día siguiente, se lavaron los cortes con PBS 0,01 M a pH 7,5 y se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (1:200; Vectastain, California, USA), diluido en TB durante 60 min a RT en una cámara húmeda. En este caso el anticuerpo secundario utilizado es biotinilado, es decir, unido covalentemente a una pequeña proteína, biotina, que servirá como sitio de anclaje para amplificadores de señal. Seguidamente se llevó a cabo la incubación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vector Laboratories, Burlingame, USA) durante 1 h a RT. Este complejo actúa como el amplificador de señal, triplicándola ya que la avidina, un homotetrámero, se une a la biotina con la que está marcado el anticuerpo primario. Transcurrido el tiempo, los cortes se lavaron con PBS 0,01 M a pH 7,5 y se revelaron con tetracloruro de la diaminobenzidina (DAB) (Vector Laboratories, Cambridgeshire, UK). Una vez se observó que las muestras iban adquiriendo un cierto color marrón, se cortó la reacción lavando con H₂O bidestilada. El DAB es el cromógeno más popular de la actividad

peroxidásica, en la reacción el H_2O_2 actúa como un sustrato enzimático y el DAB es el donante de electrones que como resultado lleva a la oxidación del DAB que forma un precipitado coloreado marrón e insoluble. Finalmente, los cortes se lavaron bien con PBS 0,01 M a pH 7,5, se deshidrataron con etanol de graduaciones crecientes y se montaron con medio de montaje Eukitt.

4.4.3.1.2. Inmunohistoquímica para Iba1, GFAP, Collagen IV

En el caso de estas inmunohistoquímicas con los diferentes marcadores de glia y vasos sanguíneos, el protocolo seguido fue el mismo descrito en el apartado 4.4.3.1.1. de material y métodos, pero sin realizar los pasos correspondientes al desenmascaramiento, ya que estos anticuerpos se sitúan de manera accesible en el citoplasma. Por lo que, tras los lavados con PBS 0,01 M a pH 7,5 y el bloqueo de la peroxidasa endógena con la solución de H_2O_2 3% en PBS-Tritón 0,1 % + 10 % metanol durante 15 min, a RT y en oscuridad, los cortes se incubaron 60 min con el TB. Posteriormente, se incubaron ON con el anticuerpo primario adecuado diluido con el TB (Tabla 3).

Al día siguiente, se realizaron 3 lavados en PBS-Tritón 0,1 % y se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario adecuado (Tabla 4). Finalmente, se lavaron con PBS 0,01 M pH 7,5, se incubaron con ABC, se revelaron con DAB, se deshidrataron y se montaron con medio de montaje Eukitt.

Anticuerpo 2º	Nombre	Color de emisión o revelado	Dilución	Casa comercial	Referencia
Biotinilado rat	Biotinilated anti-rat IgG (H+L)	Marrón	1:200	Vectastain, California, USA	BA-9400
Biotinilado rabbit	Biotinilated anti-rabbit IgG (H+L)	Marrón	1:200	Vectastain, California, USA	PK-6101
Alexa Fluor 488	Alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG (H+L)	Verde	1:200	Molecular Probes, Llinars del Vallès, Barcelona	A11008
Cy3	Cy3 conjugated anti-mouse IgG (H+L)	Rojo	1:200	Jackson Immunoresearch, Baltimore, USA	115-165-003
Alexa Fluor 488	Alexa 488-conjugated anti-rat IgG (H+L)	Verde	1:200	Molecular Probes, Llinars del Vallès, Barcelona	A11006
Alexa Fluor 594	Alexa 594-conjugated anti-rabbit IgG (H+L)	Rojo	1:200	Molecular Probes, Llinars del Vallès, Barcelona	A21207

Tabla 4. Lista de anticuerpos secundarios utilizados para técnicas de inmunohistoquímica. Se detallan su nombre comercial y completo, el color de emisión o revelado, la dilución a la que se ha usado, su casa comercial y su referencia del catálogo.

4.4.3.2. Técnica de inmunohistoquímica de fluorescencia

La inmunofluorescencia consiste en visualizar el antígeno de interés con un marcaje realizado con un fluorocromo unido directamente al anticuerpo secundario que emite fluorescencia a una longitud de onda específica y que es detectada a través del microscopio de fluorescencia.

4.4.3.2.1. Inmunohistoquímica de fluorescencia simple: GFAP, ED1, Collagen IV y MAP2

Todo el proceso se realizó en una cámara húmeda y en oscuridad.

Se seleccionaron los cortes y se lavaron previamente con PBS 0,01 M a pH 7,5. A continuación, se realizó el bloqueo con TB durante 2 h. Se incubaron con el anticuerpo primario adecuado ON a 4 °C (Tabla 3).

Al día siguiente, se realizaron lavados con PBS-Tritón 0,1 % e incubaron con el anticuerpo secundario adecuado que lleva el fluoróforo durante 2 h (Tabla 4). Se lavaron repetidamente con PBS-Tritón 0,1 % y se montaron con medio de montaje que incluye DAPI (Vectashield, Vector Lab, Cambridgeshire, UK). Para el caso de la inmunofluorescencia de MAP2, se omitió el paso de incubación con el anticuerpo secundario, puesto que el anticuerpo primario y el secundario con el fluoróforo estaban unidos. Los cortes fueron observados en un microscopio de fluorescencia a una longitud de onda adecuada al fluoróforo.

4.4.3.2.2. Inmunohistoquímica de fluorescencia de doble marcaje: CollagenIV/BrdU, GFAP/BrdU, Iba1/BrdU y MAP2/BrdU

Para los estudios de colocalización el protocolo seguido es el siguiente:

Una vez seleccionados los cortes, se realizaron lavados con PBS 0,01 M a pH 7,5.

Seguidamente, se llevó a cabo el desmascaramiento y bloqueo de la peroxidasa endógena siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.4.3.1.1. de material y métodos.

A continuación, se incubaron durante 60 min con TB y luego se diluyó el anticuerpo primario rata anti BrdU (1:200; Abcam, Cambridge, UK) en TB y se incubaron los cortes con esta solución ON y en oscuridad a 4 °C. Al día siguiente, se lavaron los cortes con PBS 0,01 M a pH 7,5 y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 4), diluido en TB durante 2h a RT.

Posteriormente, se realizaron lavados con PBS-Tritón 0,1% e incubaron con el anticuerpo primario adecuado para cada caso diluido en TB, ON y en oscuridad a 4 °C (Tabla 3). Al día siguiente, se lavaron los cortes con PBS 0,01 M a pH 7,5 y se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado para cada caso (Tabla 4). Finalmente, se lavaron repetidamente con PBS-Tritón 0.1 % y se utilizó medio de montaje que incluye DAPI. Los cortes fueron observados en un microscopio de fluorescencia a una longitud de onda adecuada a cada fluoróforo.

5. Obtención y tratamiento de los resultados

5.1. Obtención de imágenes

5.1.1. Microscopía de campo claro

Las imágenes de las tinciones y las imágenes de las inmunohistoquímicas realizadas mediante la técnica de inmunoperoxidasa fueron observadas al microscopio de campo claro (Leica DM2000) y fotografiadas mediante una cámara digital (Nikon DS-Fi1) unida al microscopio.

5.1.2. Microscopía de fluorescencia y confocal

Las inmunofluorescencias obtenidas de las muestras fueron observadas al microscopio de fluorescencia (Leica DM2000) y fotografiadas con una cámara digital (Nikon DS-Fi1) unida al microscopio y/o con un microscopio confocal (Nikon, Confocal Microscope D-Eclipse C1) y fotografiadas con una cámara digital (Nikon DS-Fi1).

5.1.3. Microscopía electrónica de transmisión

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

Todas estas señales se pueden emplear para obtener información sobre la naturaleza de la muestra como morfología, composición, estructura cristalina, estructura electrónica, etc. De modo que, las muestras tratadas para este fin fueron observadas al microscopio electrónico de transmisión (FEI Europe, Eindhoven, Netherlands) y se obtuvieron imágenes digitales de las zonas colindantes a la lesión (Morada, Olympus Soft Image Solutions GmbH, Münster, Germany).

5.2. Contaje y análisis estadístico

5.2.1. Estudio *in vitro*

Los datos de la técnica de MTT se obtuvieron mediante un espectrofotómetro realizando la lectura a 550 nm. Luego se analizaron los datos y se realizó el análisis estadístico

de estos mediante el programa estadístico SPSS 17.0. Los datos se presentaron como el porcentaje de viabilidad obtenido.

Por otra parte, para el estudio de la inmunofluorescencia de PI, se realizaron 3 fotos aleatorias en cada pocillo mediante el microscopio de fluorescencia invertido, posteriormente se llevó a cabo un conteo celular de las células marcadas con Hoechst y las células marcadas con PI de forma manual mediante el programa informático adobe photoshop CS6 y por último los datos se analizaron y se determinó la diferencia estadística mediante el SPSS 17.0. Los datos se presentaron como el porcentaje de muerte celular obtenido.

En ambos casos, las diferencias estadísticas fueron medidas mediante el análisis de la varianza de una vía (one-way-ANOVA) seguido de Fisher's LSD test para la comparación de más de dos variables.

Los datos se representaron como la media \pm error estándar (SEM) y las diferencias fueron consideradas significantes a $p < 0,05$.

Los datos de las áreas de GSH, GSSG y glutamato se determinaron mediante HPLC para cada una de las muestras del estudio, así como de cada uno de los patrones. Conocidas estas áreas obtuvimos las concentraciones de GSH, GSSG y glutamato. Dichas concentraciones de GSH, GSSG y glutamato, se refirieron a sus respectivas concentraciones de proteínas obtenidas mediante el método de Lowry y colaboradores (Lowry et al., 1951).

5.2.2. Estudio *ex vivo* e *in vivo*

Los datos de las áreas de GSH, GSSG, glutamato y MDA se determinaron mediante HPLC para cada una de las muestras de los cinco animales, así como de cada uno de los patrones. Conocidas estas áreas obtuvimos las concentraciones de GSH, GSSG, glutamato y MDA. Las concentraciones de GSH, GSSG y glutamato, se refirieron a sus respectivas concentraciones de proteínas obtenidas mediante el método de Lowry y colaboradores (Lowry et al., 1951).

Por otra parte, los recuentos celulares se realizaron en 4 cortes de cada animal a partir de las inmunohistoquímicas realizadas. En el caso del primer estudio del modelo de tratamiento con LA tras CR a corto y largo plazo *in vivo*, se delimitaron las primeras 500 μm colindantes a la lesión. En el caso del segundo estudio del modelo de tratamiento con LA y BMDC tras CR *in vivo*, se delimitaron las primeras 100 μm colindantes a la lesión. El número total de células trasplantadas se llevó a cabo contando todas las células GFP⁺ encontradas en todas las secciones coronales de todos los animales controles y criolesionados trasplantados. El número de células de las técnicas inmunohistoquímicas fue determinado por la presencia de núcleos y referido al total de área cuantificada (n° cells/mm²). El porcentaje de área ocupada por la glia y vasos sanguíneos fue calculado como el total de área ocupada por los diferentes marcadores referido al área total cuantificada. En el segundo estudio del modelo de tratamiento con LA y BMDC tras CR *in vivo*, se realizó la cuantificación del número de vasos sanguíneos y diámetro de los vasos sanguíneos en las 100 primeras micras colindantes a la lesión. El número de vasos sanguíneos fue estimado como el número total de vasos sanguíneos referidos al área total cuantificada (n° cells/mm²). Por otra parte, el diámetro de los vasos sanguíneos fue

expresado como la media del diámetro de todos los vasos sanguíneos situados en estas primeras 100 micras colindantes a la lesión para cada uno de los diferentes grupos. La medidas planimétricas de los cuerpos celulares y del área total se calcularon mediante el software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

La cuantificación de las células BrdU se realizó mediante un Microscopio Leica DM 2000 en las primeras 100 micras colindantes a la lesión y se representó como el ratio del número total de cuerpos celulares marcados mediante la técnica inmunohistoquímica referidos al área total cuantificada.

La cuantificación de las colocalizaciones celulares de BrdU, Colágeno IV, GFAP e Iba 1 fue estimada en las primeras 100 micras colindantes a la lesión de todas las secciones coronales que presentaron CR y fue expresado como el porcentaje de células doble positivas. Para el estudio bioquímico los homogenados de cada grupo de animales fueron realizados por duplicado y la densidad de las bandas (expresados como el ratio de COL4A2, Caspasa 3, BDNF o NFκB/ Actina) fueron analizados con el programa ImageQuant TL.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS 17.0. Las diferencias estadísticas fueron medidas mediante el análisis de la varianza de una vía (one-way-ANOVA) seguido de Fishe's LSD test para la comparación de más de dos variables.

Los datos se representaron como la media \pm desviación estándar (SD) y las diferencias fueron consideradas significantes a $p < 0,05$. El primer asterisco sobre las barras indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control y el segundo asterisco sobre las barras indica diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo criolesionado.

RESULTADOS

1. Evaluación *in vitro* del efecto del ácido lipoico sobre la viabilidad celular y el daño oxidativo en células sometidas a estrés.

1.1. Estudio de la viabilidad celular tras el uso de diferentes estresores celulares y el post-tratamiento con ácido lipoico en cultivos primarios de la corteza cerebral.

Una de las principales consecuencias de las lesiones cerebrales es la muerte celular. Debido a esta muerte, muchas sustancias neurotóxicas se liberan al medio extracelular, promoviendo un aumento de ERO (Kaur and Ling, 2008), un descenso de GSH y la activación de procesos de apoptosis/necrosis. Además, hemos destacado como las ERO pueden tener un papel importante en promover la neuroinflamación post-traumática que conlleva a una activación glial crónica y una muerte neuronal causando estrés oxidativo (Cederberg and Siesjo, 2010, Raslan et al., 2012).

Por tanto, el primer objetivo de este trabajo fue analizar en un cultivo primario de corteza cerebral (Figura 24), el efecto del tratamiento del LA como antioxidante y antiinflamatorio, tras la aplicación de diferentes moléculas que simulan los efectos ocasionados en un trauma cerebral o tras un proceso neurodegenerativo.

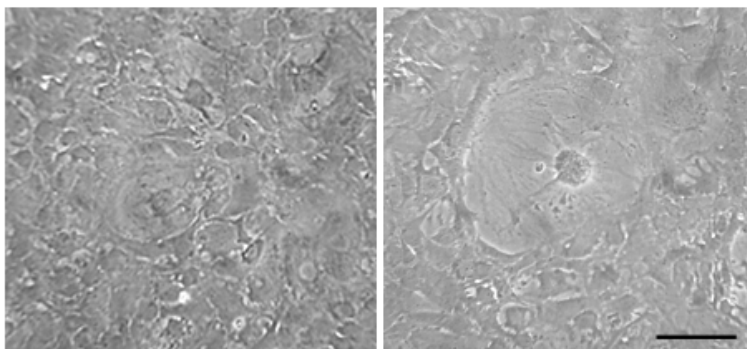


Fig.24. Fotografías del cultivo primario de la corteza cerebral realizado con ratones C57BL/6 PNO. Escala: 40 μ m

Para ello, primero se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT y también a través de la inmunofluorescencia de PI/Hoechst, en células que se trataron con LA posteriormente a la aplicación de una combinación de dos moléculas que incrementan el daño celular. Estas moléculas son, la dopamina, que produce una disfunción celular y un aumento de radicales libres y el LPS, que desencadena una respuesta inflamatoria.

Los resultados de la inmunofluorescencia ponen de manifiesto un incremento de las células positivas para PI en los pocillos celulares a los que se les aplicaron los estresores LPS 0,001 mg/ml + Dopamina 50 μ M durante 36 h (Figura 25 B), así como en los pocillos celulares que fueron tratados posteriormente con LA 100 μ M durante 24 h (Figura 25 C), con respecto a los controles (Figura 25 A).

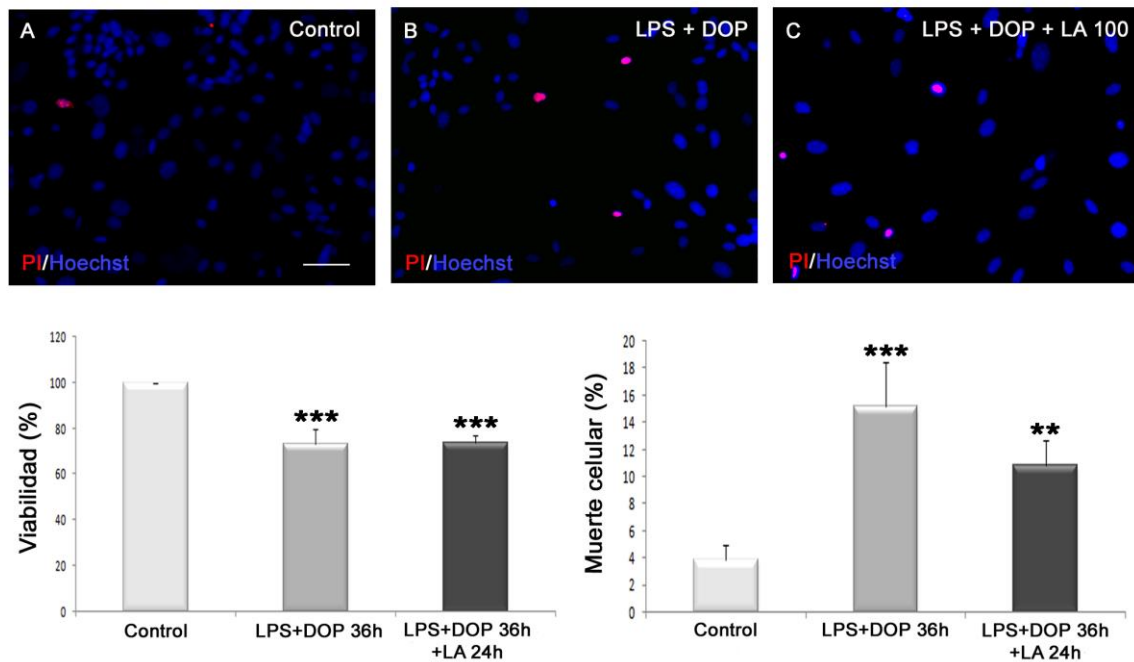


Fig.25. Efecto del LA utilizado como post-tratamiento en la toxicidad mediada por el LPS y Dopamina. (A) La células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos a una concentración de 50.000 células/pocillo y (B) tratadas con LPS 0,001 mg/ml + Dopamina 50 μ M 36 h o (C) tratadas con LPS 0,001 mg/ml + Dopamina 50 μ M 36 h + LA 100 μ M durante 24 h. Posteriormente, la viabilidad celular (%) y la muerte celular (%) se determinaron con el ensayo de MTT y la inmuno de PI/Hoechst respectivamente. (Gráficos) Los valores demuestran que el uso de los estresores LPS + Dopamina reduce la viabilidad celular y aumenta la muerte celular ($p < 0,001$) comparado con los valores controles. Además, el tratamiento con el LA no es capaz de aumentar esta viabilidad de manera significativa, comparado con los valores obtenidos tras la administración de los estresores. Escala: 100 μ m. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Para determinar de manera cuantitativa esta viabilidad y muerte celular se realizó un ensayo con MTT mediante el cual se evaluó el porcentaje de viabilidad obtenido en cada uno de los grupos de estudio, así como el porcentaje de muerte celular obtenido tras la realización de la inmunofluorescencia PI/Hoechst. Los valores muestran que el uso de los estresores LPS 0,001 mg/ml + Dopamina 50 μ M durante 36 h en las células de cultivo (LPS+DOP 36h), reduce la viabilidad y aumenta la muerte celular de manera significativa ($p < 0,001$) comparado con los valores controles (Control). Sin embargo, este aumento es menos pronunciado tras el tratamiento con el LA durante 24h (LPS+DOP 36h+LA 24h), pues se observa una tendencia a la disminución de la muerte celular comparado con los valores obtenidos tras la administración de los estresores LPS + Dopamina (LPS+DOP 36h). Por el contrario, no se observa una mejora de la viabilidad celular tras el tratamiento con el LA (LPS+DOP 36h+LA 24h), mostrando una disminución significativa ($p < 0,001$) respecto al grupo control (Figura 25 Gráficos).

Por último, se evaluó el porcentaje de viabilidad así como el porcentaje de muerte celular con el post-tratamiento del LA tras el uso del estresor BSO que como se ha comentado anteriormente, es un inhibidor del GSH, causando finalmente la muerte celular.

Los resultados obtenidos con la inmunofluorescencia de PI/Hoechst sugieren un incremento de las células positivas para PI en los pocillos celulares tratados con el estresor BSO 1 mM durante 36 h (Figura 26 B) respecto a los controles (Figura 26 A) y a los pocillos tratados con LA 100 μ M durante 24 h (Figura 26 C).

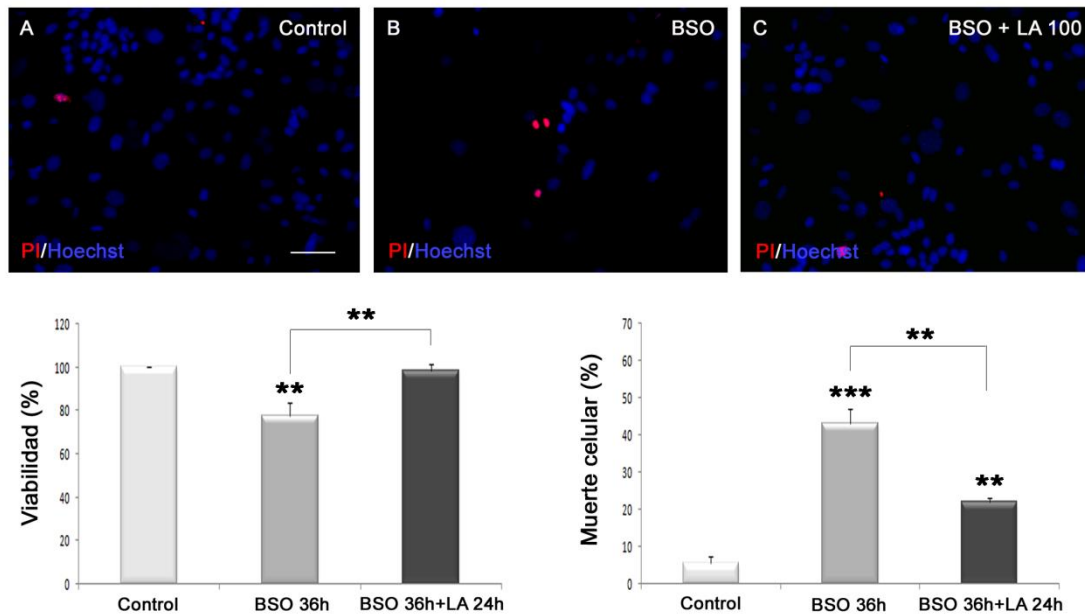


Fig.26. Efecto del LA utilizado como post-tratamiento en la toxicidad mediada por BSO. (A) Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos a una concentración de 50.000 células/pocillo, y (B) tratadas con BSO 1 mM 36 h o (C) tratadas con BSO 1 mM 36 h + LA 100 μ M durante 24 h. Posteriormente, la viabilidad celular (%) y la muerte celular (%) se determinaron con el ensayo de MTT y la inmuno de PI/Hoechst respectivamente. (Gráficos) Los resultados sugieren que el uso del estresor BSO reduce la viabilidad celular y aumenta la muerte celular significativamente ($p < 0,01$; $p < 0,001$ respectivamente) cuando lo comparamos con los valores controles. Sin embargo, el tratamiento con el LA mejora esta viabilidad celular ($p < 0,01$) y disminuye la muerte celular ($p < 0,01$) de manera significativa respecto a los valores obtenidos tras la administración del estresor BSO. Escala: 100 μ m. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Con el fin de comprobar estos datos se realizó un ensayo con MTT y se evaluó el porcentaje de viabilidad obtenido en cada uno de los grupos de estudio, así como el porcentaje de muerte celular obtenido tras la realización de la inmunofluorescencia PI/Hoechst. Los valores sugieren que el uso del estresor BSO 1mM durante 36 h (BSO 36h), reduce la viabilidad celular y aumenta la muerte celular de las células de cultivo de manera significativa ($p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente) cuando lo comparamos con el grupo control (Control). Sin embargo, el tratamiento con el LA durante 24h (BSO 36h+LA 24h) aumenta esta viabilidad celular y disminuye la muerte celular significativamente ($p < 0,01$), respecto a los valores obtenidos tras la administración del estresor BSO (BSO 36h) (Figura 26 Gráficos).

1.2. Estudio del estrés oxidativo tras el uso de diferentes estresores celulares y el post-tratamiento con ácido lipoico en cultivos primarios de la corteza cerebral.

Se determinó el estrés oxidativo de las células de los mismos grupos de estudio en los que se analizó la viabilidad celular. Para ello se cuantificaron las concentraciones de GSH, GSSG y glutamato mediante HPLC.

Los resultados de los niveles de GSH (Figura 27) muestran un aumento severo y estadísticamente significativo ($p < 0,01$) de sus valores en las células tratadas con los estresores LPS+DOP, así como un aumento menos elevado, pero también estadísticamente significativo ($p < 0,05$), tras el tratamiento con LA (LPS+DOP+LA), cuando se comparan los valores con los obtenidos en las células del grupo control. Por otra parte, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo no tratado (Control), el grupo tratado con BSO y el grupo tratado posteriormente con LA (BSO+LA).

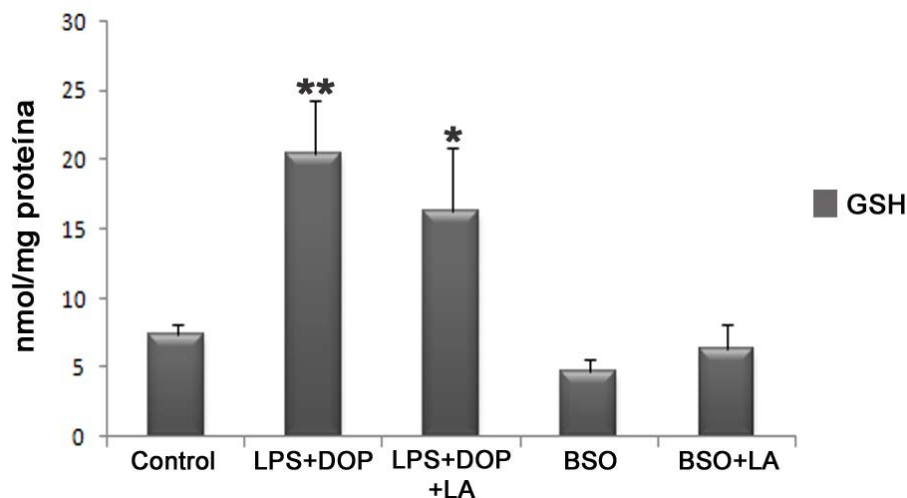


Fig.27. Efecto del LA utilizado como post-tratamiento en la toxicidad celular mediada por LPS y Dopamina, así como BSO, sobre la concentración de GSH (nmol/mg prot) determinado por HPLC. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

En cuanto a los niveles de GSSG (Figura 28) se observa un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,01$) de sus valores en las células tratadas con LPS+ DOP. Sin embargo, se muestra una tendencia a la disminución de estos valores cuando las células son tratadas con LA, aunque sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Por otra parte, no se encuentran tendencias ni diferencias estadísticamente significativas entre el grupo no tratado (Control), el grupo tratado con BSO y el grupo tratado posteriormente con LA (BSO+LA).

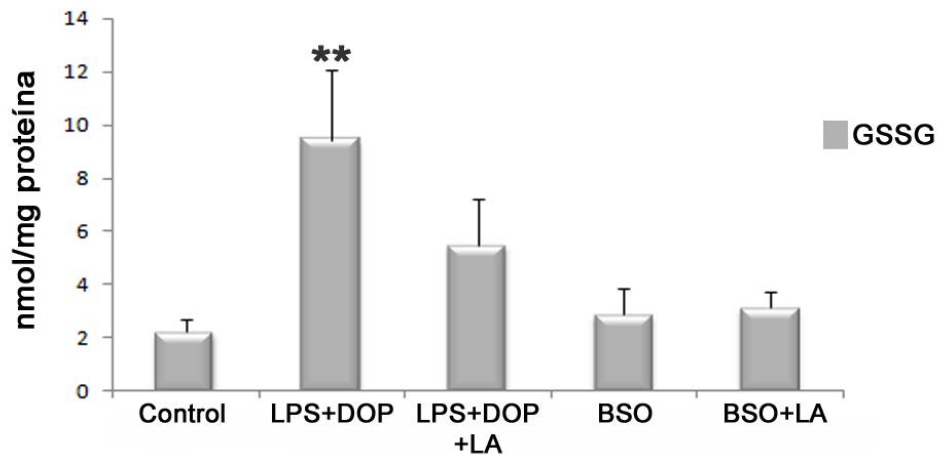


Fig.28. Efecto del LA utilizado como post-tratamiento en la toxicidad celular mediada por LPS y Dopamina, así como BSO, sobre la concentración de GSSG (nmol/mg prot) determinado por HPLC. ** $p < 0,01$.

Obtenidos estos valores, se calculó el ratio GSH/GSSG (Figura 29), observándose una tendencia a la disminución en el grupo tratado con los estresores LPS+DOP cuando se compara con el grupo no tratado (Control). Sin embargo, se muestra una tendencia al incremento de estos valores tras el tratamiento con LA, aunque sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre grupos. Por otra parte, se observa una tendencia a la disminución de los valores obtenidos en los grupos tratados con BSO o BSO+LA con respecto al grupo control.

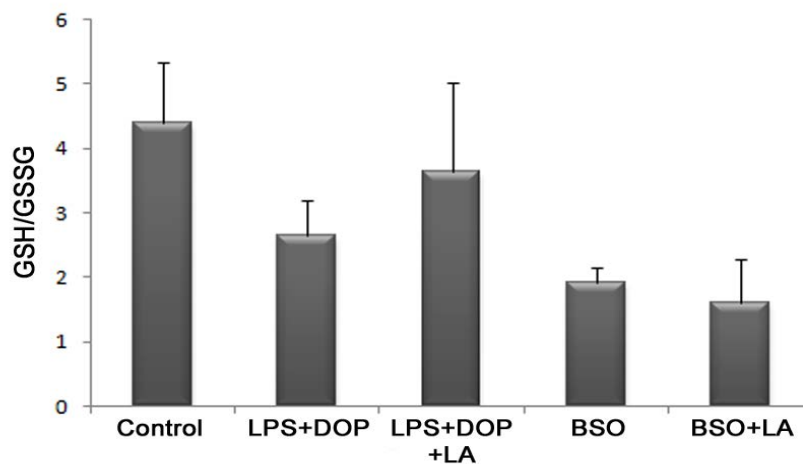


Fig.29. Efecto del LA utilizado como post-tratamiento en la toxicidad celular mediada por LPS y Dopamina, así como BSO, sobre el ratio de GSH (nmol/mg prot)/GSSG (nmol/mg prot) determinado por HPLC.

Por último, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los niveles de glutamato de los grupos estudiados (Figura 30). Estos datos sugieren que no hay una nueva síntesis de GSH puesto que los niveles de glutamato, precursor para la síntesis de GSH, no disminuyen.

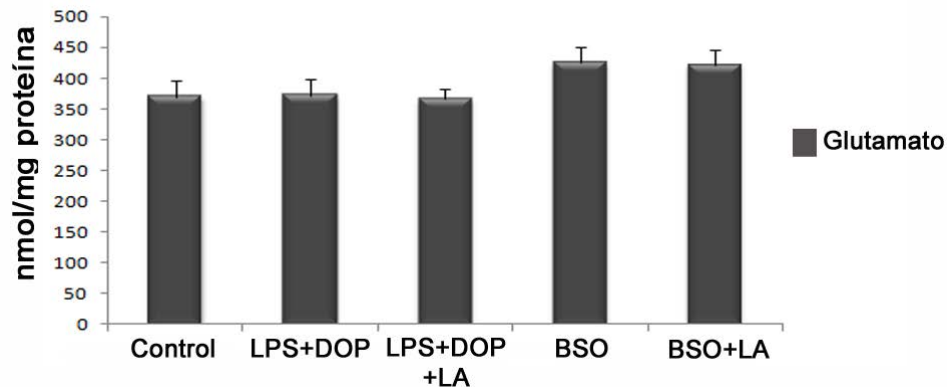


Fig.30. Efecto del LA utilizado como post-tratamiento en la toxicidad celular mediada por LPS y Dopamina, así como BSO, sobre la concentración de glutamato (nmol/mg prot) determinado por HPLC.

2. Evaluación *ex vivo* del tratamiento con ácido lipoico en una situación de estrés oxidativo provocada químicamente

Muchos estudios han dado a conocer las propiedades antioxidantes del LA después de un trauma cerebral (Packer et al., 1997, Lynch, 2001, Ozbal et al., 2015) aumentando la producción de GSH (Packer et al., 1995a, Toklu et al., 2009) y ayudando a la recuperación de la BHE. De manera similar, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio se midieron los valores de GSH mediante HPLC tanto de animales controles, como de animales a los que se les había realizado una CR y animales criolesionados tratados con LA, todos ellos sacrificados a los 7 días de la CR, observándose como en los animales tratados con LA, los niveles de GSH se incrementaban significativamente ($p < 0,01$) comparado con el grupo criolesionado no tratado (Rocamonde et al., 2012).

Sin embargo, en el presente trabajo damos un paso más intentando elucidar el posible mecanismo del LA en este incremento del GSH. Para ello, provocamos un daño oxidativo en un homogenado de cerebro mediante el uso del Fe (II) y ácido ascórbico que luego tratamos con diferentes concentraciones de LA tal y como hemos descrito en el apartado 2.2.1. de material y métodos, para posteriormente medir las concentraciones de GSH, GSSG y glutamato, así como el MDA, uno de los productos finales de la peroxidación de los lípidos de membrana.

En primer lugar (Figura 31), se detecta un aumento significativo en los niveles de GSH de las muestras tratadas con LA a 4 μM ($p < 0,05$) y 10 μM ($p < 0,001$) cuando comparamos con muestras no tratadas con LA (LA 0) o tratadas a una concentración de 0,5, 1 o 2 μM de LA. Además, se observa un incremento significativo ($p < 0,001$) en los niveles de GSH de las muestras tratadas con LA 10 μM comparado con las muestras que tienen concentraciones de 4 μM .

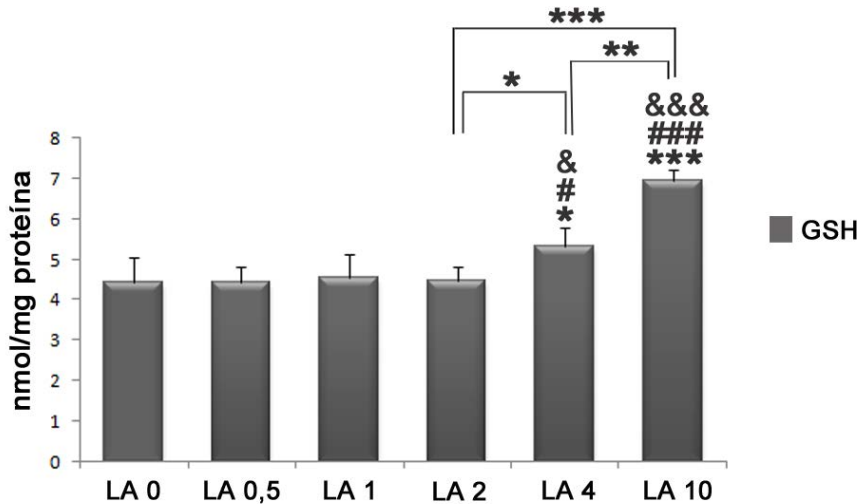


Fig.31. Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de LA (0-0,5-1-2-4 y 10 μM) en homogenados de cerebro sobre la concentración de GSH (nmol/mg prot) determinado por HPLC. Significado de los diferentes símbolos sobre las barras de error: * $p < 0,05$ vs LA 0; ** $p < 0,01$ vs LA 0; *** $p < 0,001$ vs LA 0; # $p < 0,05$ vs LA 0,5; ### $p < 0,001$ vs LA 0,5; & $p < 0,05$ vs LA 1; && $p < 0,01$ vs LA 1; &&& $p < 0,001$ vs LA 1.

En cuanto a los niveles de GSSG (Figura 32), se observa una disminución de sus valores al aumentar la concentración de LA.

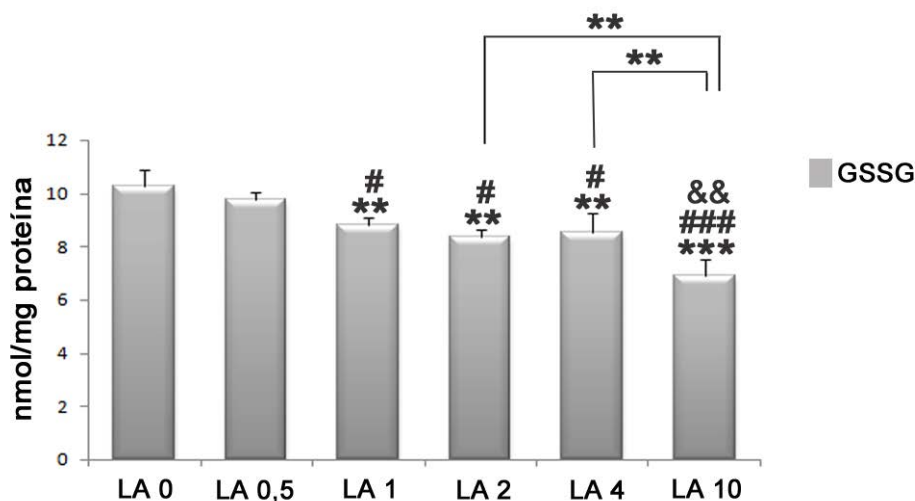


Fig.32. Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de LA (0-0,5-1-2-4 y 10 μM) en homogenados de cerebro sobre la concentración de GSSG (nmol/mg prot) determinado por HPLC. Significado de los diferentes símbolos sobre las barras de error: ** $p < 0,01$ vs LA 0; *** $p < 0,001$ vs LA 0; # $p < 0,05$ vs LA 0,5; ### $p < 0,001$ vs LA 0,5; & $p < 0,05$ vs LA 1; && $p < 0,01$ vs LA 1; &&& $p < 0,001$ vs LA 1.

En concreto, se ha observado una disminución significativa de GSSG especialmente severa en las muestras tratadas con LA a 10 μM (LA 10) comparado con las muestras no tratadas (LA 0) o tratadas con LA a 0,5 μM ($p < 0,001$). Así como una disminución significativa de este grupo (LA 10) cuando se compara con las muestras tratadas con LA a 1, 2 y 4 μM ($p < 0,01$). Por último, se observan diferencias significativas en las muestras tratadas con LA a 1, 2 y 4 μM comparado con las muestras no tratadas ($p < 0,01$) o tratadas con LA a 0,5 μM ($p < 0,05$).

Por lo tanto, se calculó el ratio GSH/GSSG (Figura 33), observándose un aumento de este al aumentar la concentración de LA. En concreto, se produce un aumento significativo del ratio en las muestras tratadas con LA a 10 μM (LA 10) comparado con las muestras no tratadas (LA 0) o tratadas con LA a 0,5-1-2 y 4 μM ($p < 0,001$). Así como un aumento significativo en el grupo LA 4 cuando se compara con las muestras no tratadas o tratadas con LA 0,5 μM ($p < 0,05$).

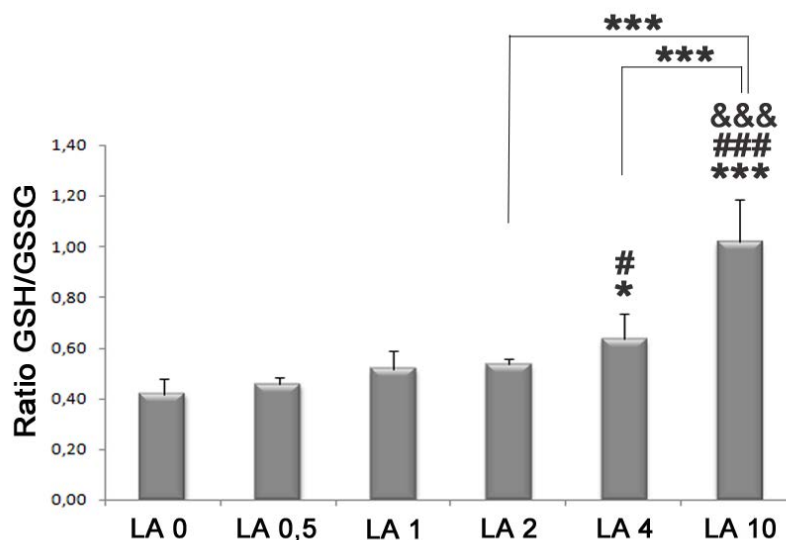


Fig.33. Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de LA (0-0,5-1-2-4 y 10 μM) en homogenados de cerebro sobre el ratio de GSH (nmol/mg prot)/GSSG (nmol/mg prot) determinado por HPLC. Significado de los diferentes símbolos sobre las barras de error: * $p < 0,05$ vs LA 0; *** $p < 0,001$ vs LA 0; # $p < 0,05$ vs LA 0,5; ### $p < 0,001$ vs LA 0,5; &&& $p < 0,001$ vs LA 1.

Por último, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los niveles de glutamato de los grupos estudiados (Figura 34). Estos datos sugieren que no hay una nueva síntesis de GSH puesto que los niveles de glutamato, precursor para la síntesis de GSH, no disminuyen.

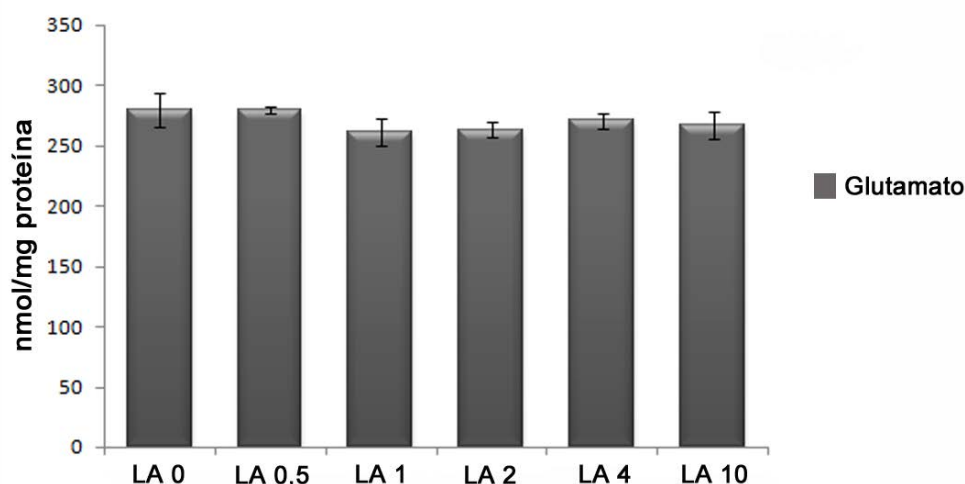


Fig.34. Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de LA (0-0,5-1-2-4 y 10 μM) en homogenados de cerebro sobre la concentración de glutamato (nmol/mg prot) determinado por HPLC.

Además, como hemos descrito anteriormente, el modelo de daño oxidativo utilizado se basa en la peroxidación lipídica. Por ello determinamos también en todos los grupos de estudio los niveles de MDA, observando una bajada de estos niveles al aumentar la concentración de LA. En concreto, se muestra una disminución estadísticamente significativa en los valores de MDA de las muestras tratadas con LA 0,5 μM comparando con las muestras no tratadas ($p < 0,05$). Sin embargo, el nivel más bajo de MDA se establece en las muestras tratadas con LA 10 μM , la máxima concentración empleada del antioxidante, en el que se observa una disminución estadísticamente significativa en los niveles de MDA comparado con las muestras no tratadas (LA 0) o tratadas con LA 0,5 y 4 μM ($p < 0,01$; $p < 0,001$ y $p < 0,05$; respectivamente).

LA (μM)	MDA (nmol/mg prot)
0	2,87 \pm 0,49
0,5	2,76 \pm 0,12
1	2,38 \pm 0,20
2	2,51 \pm 0,16
4	2,70 \pm 0,05
10	2,16 \pm 0,05

Tabla 5. Tabla en la que se presenta la concentración de MDA (nmol/mg proteína) determinado por HPLC a las diferentes concentraciones de LA (0-0,5-1-2-4 y 10 μM) \pm la desviación estándar.

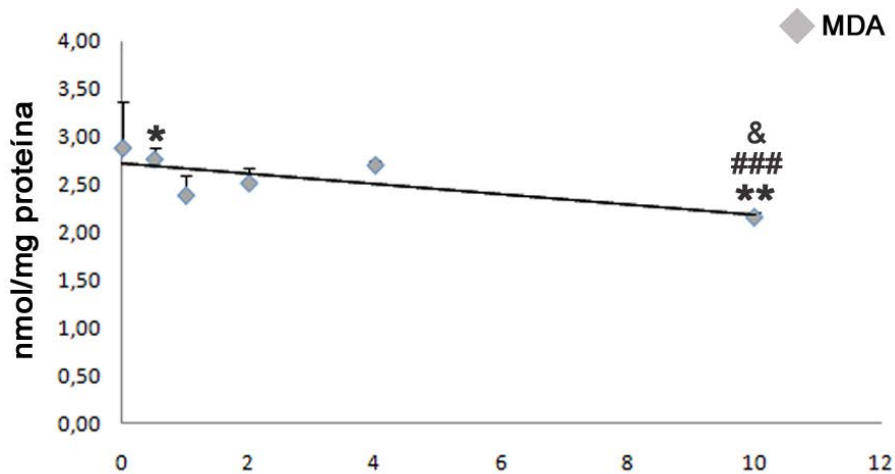


Fig.35. Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de LA (0-0,5-1-2-4 y 10 µM) en homogenados de cerebro sobre la concentración de MDA (nmol/mg prot) determinado por HPLC. Significado de los diferentes símbolos sobre las barras de error: * $p < 0,05$ LA 0,5 vs LA 0; ** $p < 0,01$ LA 10 vs LA 0; ### $p < 0,001$ LA 10 vs LA 0,5; & $p < 0,05$ LA 10 vs LA 4.

3. Efecto *in vivo* del tratamiento con ácido lipoico como estrategia reparativa tras el modelo de criolesión a corto y largo plazo.

3.1. Caracterización histológica del área dañada

Los resultados obtenidos en los estudios realizados en los apartados previos 1 y 2 junto con los resultados publicados previamente por nuestro grupo de investigación, sugieren fuertemente que el LA tiene un importante efecto beneficioso tras un daño cerebral.

Con el fin de evaluar este efecto *in vivo* tras un modelo de CR a corto y largo plazo, se planteó como primer objetivo la caracterización morfológica del daño cerebral cortical realizado en los animales, y para ello primero se llevó a cabo una tinción de HE a los 15 y 60 días tras la CR, tal y como se explica en el apartado 4.4.2. de material y métodos. Posteriormente, se estudiaron las imágenes obtenidas tanto de secciones de semifino como mediante microscopía electrónica de animales no tratados.

Tras el análisis de secciones coronales y transversales de cerebros de animales procedentes del estudio a corto plazo, se observó que la CR se localizaba próxima al ventrículo lateral (LV; lateral ventricle) (Figura 36 A y B). Además, cuando examinamos secciones de semifinos teñidos con azul de toluidina, procedentes de animales no tratados se observó que en el área adyacente a la lesión quedaban muy bien definidas tres zonas claramente distinguibles y delimitadas (Figura 36 C).

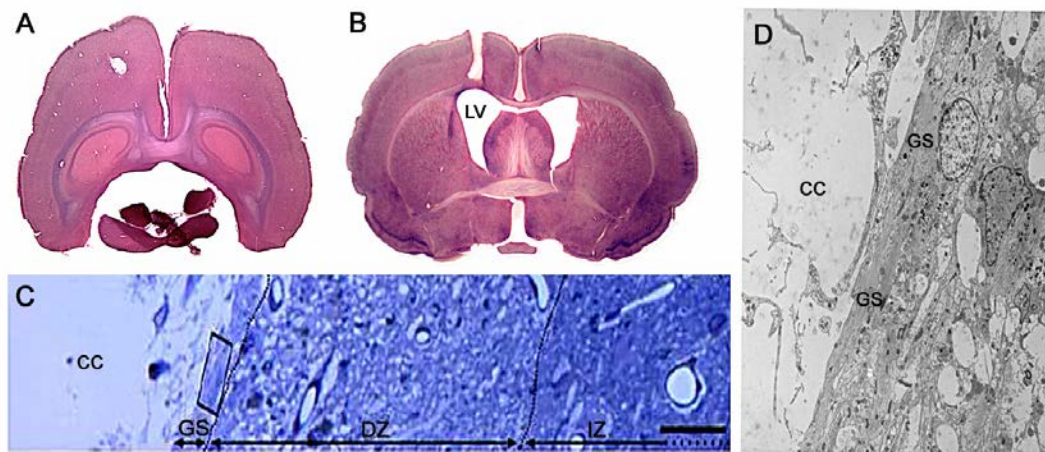


Fig. 36. Caracterización histológica del área dañada en rata. (A) Tinción de HE de la CR, situada próxima al LV en una sección transversal y (B) una sección coronal de animales no tratados sacrificados 15 días tras la CR. (C) Fotografía de un semifino de un animal no tratado y sacrificado 15 días tras la CR. Las líneas punteadas delimitan las tres zonas principales. CC: cavidad cística; GS: cicatriz glial; DZ: zona dañada; IZ: zona intacta. (D) Imagen obtenida por TEM de la cicatriz glial. Escala: (A y B) 2 mm, (C) 50 μ m y (D) 10 μ m.

La primera zona es aquella más próxima a la cavidad cística (CC) formada por la cicatriz glial (GS; glial scar). Le sigue una zona dañada (DZ; damaged zone) caracterizada por la existencia de múltiples espacios intercelulares, células en proceso de apoptosis y algunas células de microglía. Por último, detectamos una tercera zona o zona intacta (IZ; intact zone) compuesta por tejido neural que no ha sufrido ningún cambio debido a la CR. Analizando la GS con más detalle mediante microscopía electrónica (Figura 36 D), confirmamos la existencia de una gran cantidad de filamentos intermedios en estas células de astrogliá que forman la GS, y que se sitúan de manera paralela al borde de la CR, creando una barrera.

En los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo, 15 días tras la lesión se observa que el tratamiento con LA evita la formación de esta GS y produce el crecimiento de tejido neural dentro de la CC. Estos resultados se mantienen en concordancia con el estudio realizado a largo plazo (60 días tras la CR), en donde observamos que los animales tratados con LA (CR+LA) muestran un borde de la lesión totalmente irregular (Figura 37 B), mientras que los animales no tratados (CR) presentan una CC perfectamente delimitada por una GS (Figura 37 A).

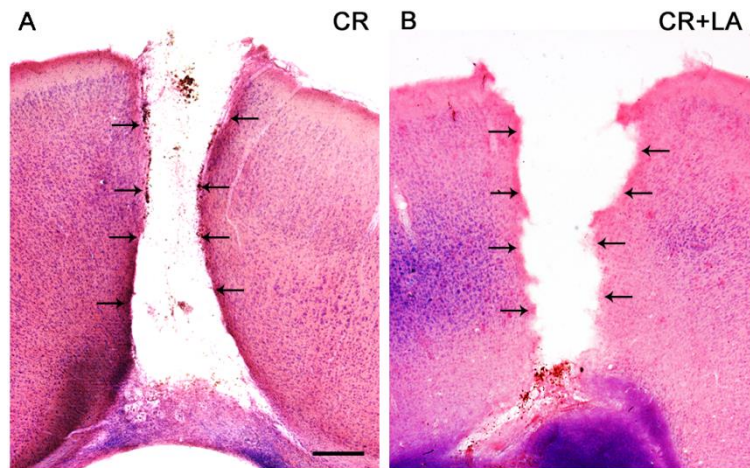


Fig.37. Tinción de HE que muestra el área dañada de (A) animales no tratados sacrificados 60 días tras la CR y (B) animales tratados con LA y sacrificados 60 días tras la CR. Las flechas señalan el borde de la lesión. Escala: 500 μ m.

3.2. Análisis de la reactividad glial tras el tratamiento con ácido lipoico

3.2.1. Análisis de la reactividad astrogliar tras el tratamiento con ácido lipoico

Como se ha mencionado en la introducción, una de las respuestas producidas tras un daño cerebral es la formación de la GS formada principalmente de astrocitos reactivos. Esta cicatriz ha sido considerada como uno de los mayores impedimentos a la regeneración de los axones dañados (Liuzzi and Lasek, 1987, Davies et al., 1997, Kawano et al., 2012) y por lo tanto a la reparación del tejido nervioso y restablecimiento funcional.

Para comprobar el posible efecto del LA sobre esta GS tanto a corto como a largo plazo, se procedió a un estudio de inmunofluorescencia para el marcador GFAP en secciones de cerebro y para los diferentes grupos experimentales.

Experimentos realizados en nuestro laboratorio y publicados en la revista *Neuroscience* muestran como el tratamiento con LA disminuye la GS que rodea el área dañada 15 días tras la CR. Es interesante remarcar, que de manera adicional en este trabajo observamos que 60 días tras la CR el efecto del LA sigue siendo el mismo, ya que los animales no tratados (CR) continúan mostrando una notable GS formada por astrocitos alrededor del área dañada (flechas en Figura 38 A), mientras que en los animales tratados (CR+LA) esta GS se muestra claramente disminuida (Figura 38 B).

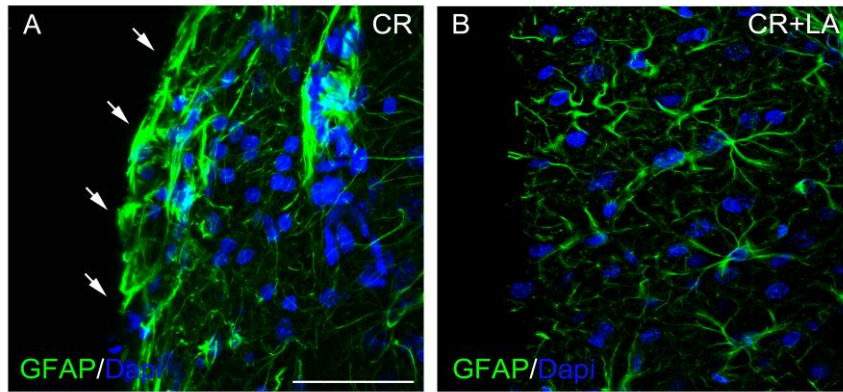


Fig.38. Inmunofluorescencia para GFAP (astrocitos en verde) en (A) animales no tratados y (B) animales tratados, 60 días tras la CR. Los núcleos de las células están marcados con DAPI (azul). Escala: 50 μ m.

Por otra parte, cuantificamos el porcentaje de área ocupada por las células astrogliales, mostrando un incremento estadísticamente significativo tanto a los 15 como a los 60 días en los animales criolesionados (CR) ($p < 0,001$ y $p < 0,05$, respectivamente) comparado con el grupo control. Sin embargo, este área se ve disminuida de manera significativa ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente) en el grupo tratado con LA (CR+LA) respecto al no tratado (CR) (Figura 39).

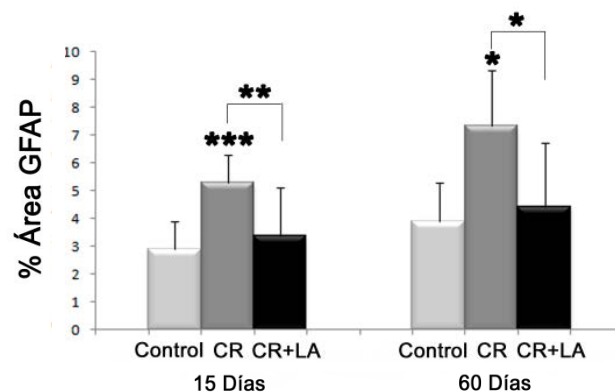


Fig.39. Cuantificación del área ocupada por los astrocitos a los 15 y 60 días tras la CR (% Área GFAP). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

3.2.2. Análisis de la reactividad microglial tras el tratamiento con ácido lipoico

Las células microgliales son las células del cerebro responsables de la respuesta inmune. Por tanto, con el fin de evaluar la respuesta microglial tras la CR a corto y largo plazo, realizamos una inmunohistoquímica para los marcadores Iba1 y ED1 tal y como se muestra en los apartados 4.4.3.1.2. y 4.4.3.2.1. de material y métodos.

Para ello, en el estudio previo nos centramos primeramente en la morfología de las células microgliales y observamos que 15 días tras la CR las células inmunoreactivas para Iba1 de los animales criolesionados no tratados (CR) mostraban en la zona lesionada, una microglía de morfología ramificada específica de microglía en reposo (Figura 40 A). Sin embargo, los animales criolesionados y tratados con lipoico (CR+LA) mostraban en esta misma zona lesionada una microglía amebode, característica de la microglía reactiva (Figura 40 B). Además, en el presente estudio se analiza la morfología de las células microgliales a largo plazo (60 días tras la CR) tanto del grupo criolesionado no tratado (CR) como del tratado (CR+LA), y se observa una morfología amebode en ambos casos (Figura 40 C y D).

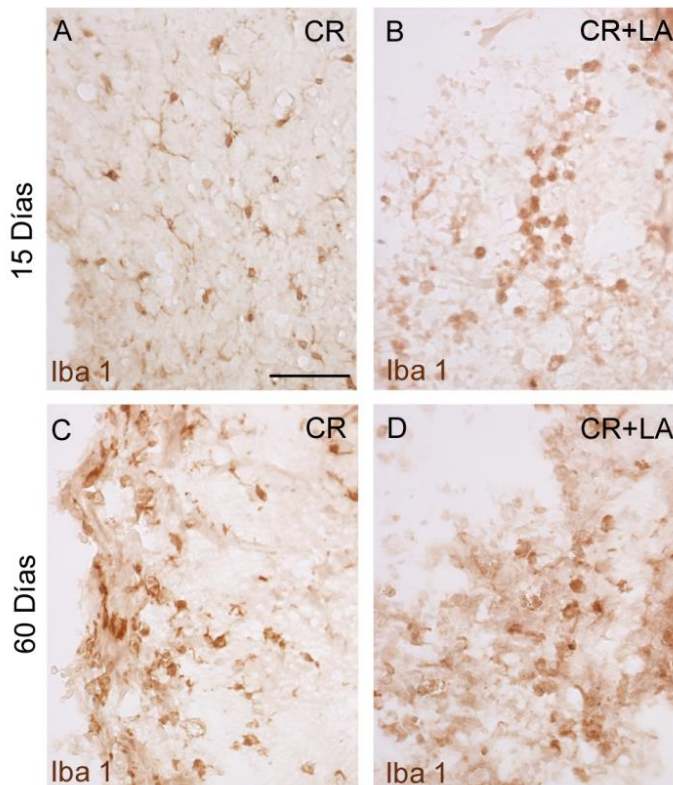


Fig.40. *Inmunohistoquímica para Iba1 (microglía) a los 15 y 60 días tras la CR. Se muestra la inmunohistoquímica en animales no tratados (A y C, respectivamente) y animales tratados con LA (B y D, respectivamente). Escala: 100 μ m.*

La cuantificación de la densidad de las células Iba1⁺ (n° células/mm²) muestra un incremento significativo ($p < 0,001$) tanto en el grupo criolesionado no tratado (CR), como en el tratado (CR+LA) 15 días tras la CR comparado con el grupo control. Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre ninguno de los grupos analizados 60 días tras la CR (Figura 41).

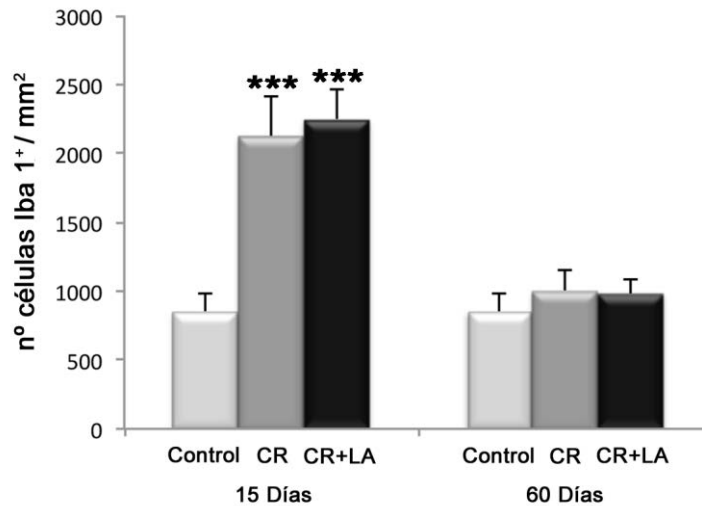


Fig.41. Cuantificación de la densidad celular de las células microgliales (n° células Iba1⁺/mm²). *** $p < 0,001$

Por otra parte, las células fagocíticas se evaluaron mediante inmunohistoquímica de fluorescencia para ED1 15 y 60 días tras la CR (Figura 42). Las imágenes obtenidas indican que a corto plazo los animales no tratados (CR) (Figura 42 A) presentan pocas células ED1 positivas cuando comparamos con los animales tratados con lipoico (CR+LA) (Figura 42 B). Sin embargo, a largo plazo tanto en los animales no tratados (CR) como en los tratados (CR+LA) se puede observar una gran cantidad de estas células (Figura 42 C y D).

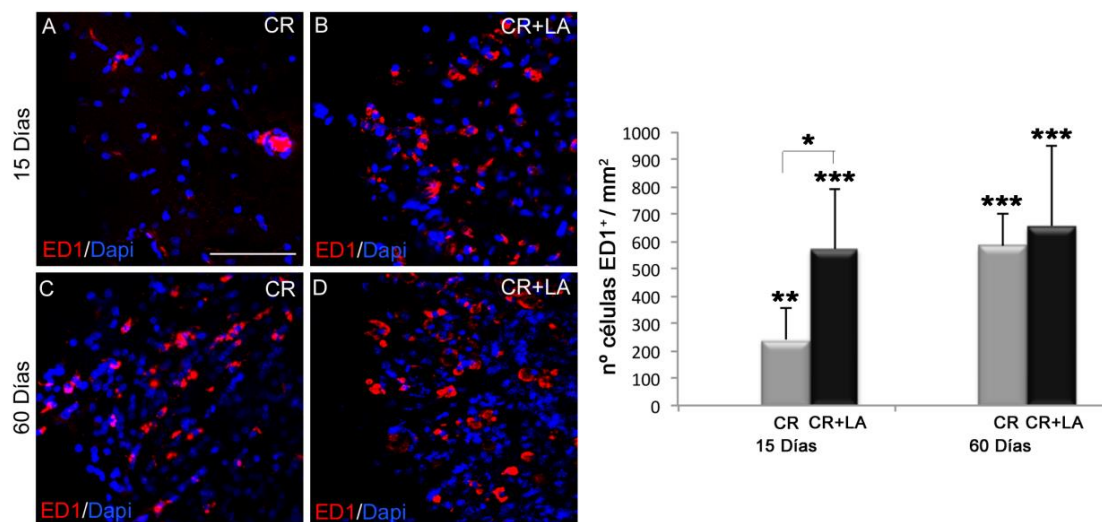


Fig.42. Inmunofluorescencia para el marcador ED1 (rojo) a los 15 y 60 días tras la CR. Se muestra la inmunofluorescencia en animales no tratados (A y C, respectivamente) y animales tratados con LA (B y D respectivamente). Los núcleos celulares se marcan con el Dapi (azul). (Gráfico) Cuantificación de la densidad celular (n° células ED1⁺/mm²) de microglía activa/macrófagos. Escala: 200 μ m. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Para verificar estas observaciones, se realizó la cuantificación de la densidad de éstas células (n° células ED1⁺/mm²). Cuando se analizan los resultados, se detecta un incremento estadísticamente significativo en ambos grupos, tanto en el criolesionado no tratado (CR) ($p < 0,01$), como en el tratado (CR+LA) ($p < 0,001$) 15 días tras la CR comparado con el grupo control. Además estas células fagocíticas muestran un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en el grupo criolesionado y tratado con lipoico (CR+LA) comparado con el no tratado (CR). Sin embargo, 60 días tras la CR se muestra un incremento de la densidad de células ED1 positivas en animales no tratados (CR), igualándose los niveles a los encontrados en los animales tratados con lipoico (CR+LA), y siendo este aumento estadísticamente significativo en ambos casos ($p < 0,001$) comparado con el control (Figura 42 Gráfico).

3.3. Estudio angiogénico tras el tratamiento con ácido lipoico

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio sobre la formación de nuevos vasos sanguíneos transcurridos 15 días desde la lesión y mediante inmunofluorescencia para el marcador Colágeno IV (Collagen IV), demostraron que el LA tenía capacidad angiogénica. Concretamente, se vio que en los animales no tratados los vasos sanguíneos presentaban un menor grosor y una distribución aleatoria a lo largo del área dañada. Sin embargo, los vasos sanguíneos de animales tratados con LA presentaban una distribución paralela y se encontraban dispuestos perpendicularmente a la lesión al tiempo que mostraban un mayor calibre. La cuantificación del área ocupada por estos vasos sanguíneos mostró un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de este área en el grupo tratado con LA (CR+LA) comparado con el grupo no tratado (CR) y con el grupo control (Figura 43 Gráfico). Por tanto, observamos que el LA promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos tras el daño cerebral comparado con animales no tratados. Con el objetivo de evaluar esta actividad angiogénica a corto y largo plazo, en el presente trabajo realizamos este mismo análisis para los animales perfundidos 60 días tras la CR y se observa una situación similar a la presentada en los animales perfundidos 15 días tras la CR. Por tanto, en los animales criolesionados (CR) los vasos sanguíneos situados en la zona dañada presentan una distribución aleatoria (Figura 43 A) mientras que en los animales criolesionados y tratados con lipoico (CR+LA) estos vasos se orientan hacia la CC paralelamente unos a otros (Figura 43 B).

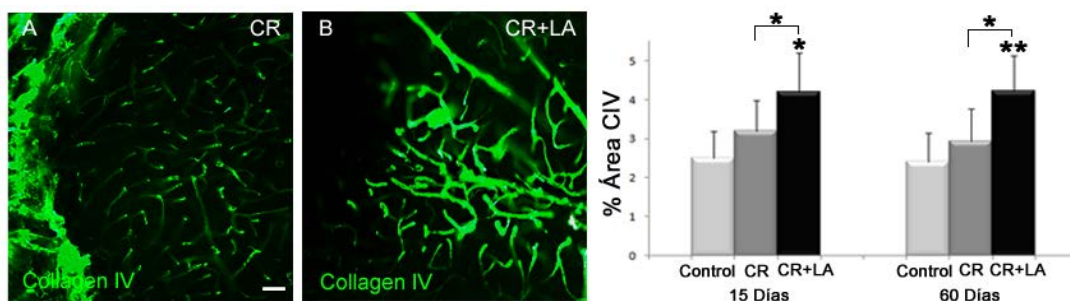


Fig.43. Inmunofluorescencia para Colágeno IV a los 60 días tras la CR. (A) Se muestra la inmunofluorescencia en animales no tratados y (B) en animales tratados con LA. (Gráfico) Cuantificación del área ocupada por los vasos sanguíneos (% área CIV) a los 15 y 60 días tras la CR. Escala: 50 μ m. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

La cuantificación del porcentaje de área ocupada por estos vasos a los 60 días de la CR sigue el mismo patrón observado en el estudio a corto plazo, de modo que ésta área es significativamente mayor ($p < 0,01$) en los animales criolesionados y tratados con lipoico (CR+LA) comparado con el grupo control. Además, se observa un incremento significativo ($p < 0,05$) del área ocupada por los vasos sanguíneos en el grupo criolesionado y tratado con lipoico (CR+LA) comparado con el criolesionado no tratado (CR) (Figura 43 Gráfico).

3.4. Análisis de la presencia de neuronas tras el tratamiento con ácido lipoico

El traumatismo craneoencefálico (TCE) es un proceso complejo que resulta en una disfunción caracterizada por un daño axonal que produce la muerte neuronal. La proteína asociada a los microtúbulos (MAP2) es esencial en las interacciones del citoesqueleto neuronal, confiere estabilidad a los microtúbulos y, por ende, se requiere para preservar la morfología y la conectividad neuronal. Tiene relación con importantes cascadas bioquímicas de reacción intracelular y extracelular, lo que la hace particularmente sensible a las alteraciones ocasionadas por la lesión cerebral (Arango-Davila et al., 2004). Se utilizó pues, este sensible marcador neuronal para observar el estado de las neuronas en el presente estudio.

Las imágenes obtenidas de las inmunofluorescencias realizadas con el marcaje de MAP2 sugieren que en los animales criolesionados y tratados con lipoico (CR+LA) estudiados tanto a corto (Figura 44 D, E y F) como a largo plazo (Figura 44 J, K y L), algunas neuronas maduras que expresan el marcador MAP2 extienden sus terminaciones nerviosas en la zona lindante a la CC (dos asteriscos en Figura 44 E, F, dos asteriscos en K y L). Por el contrario, en aquellos animales criolesionados no tratados con lipoico (CR) estudiados tanto a corto (Figura 44 A, B y C) como a largo plazo (Figura 44 G, H e I) no encontramos estas extensiones nerviosas en la zona adyacente a la CC (flechas en Figura 44 B y H).

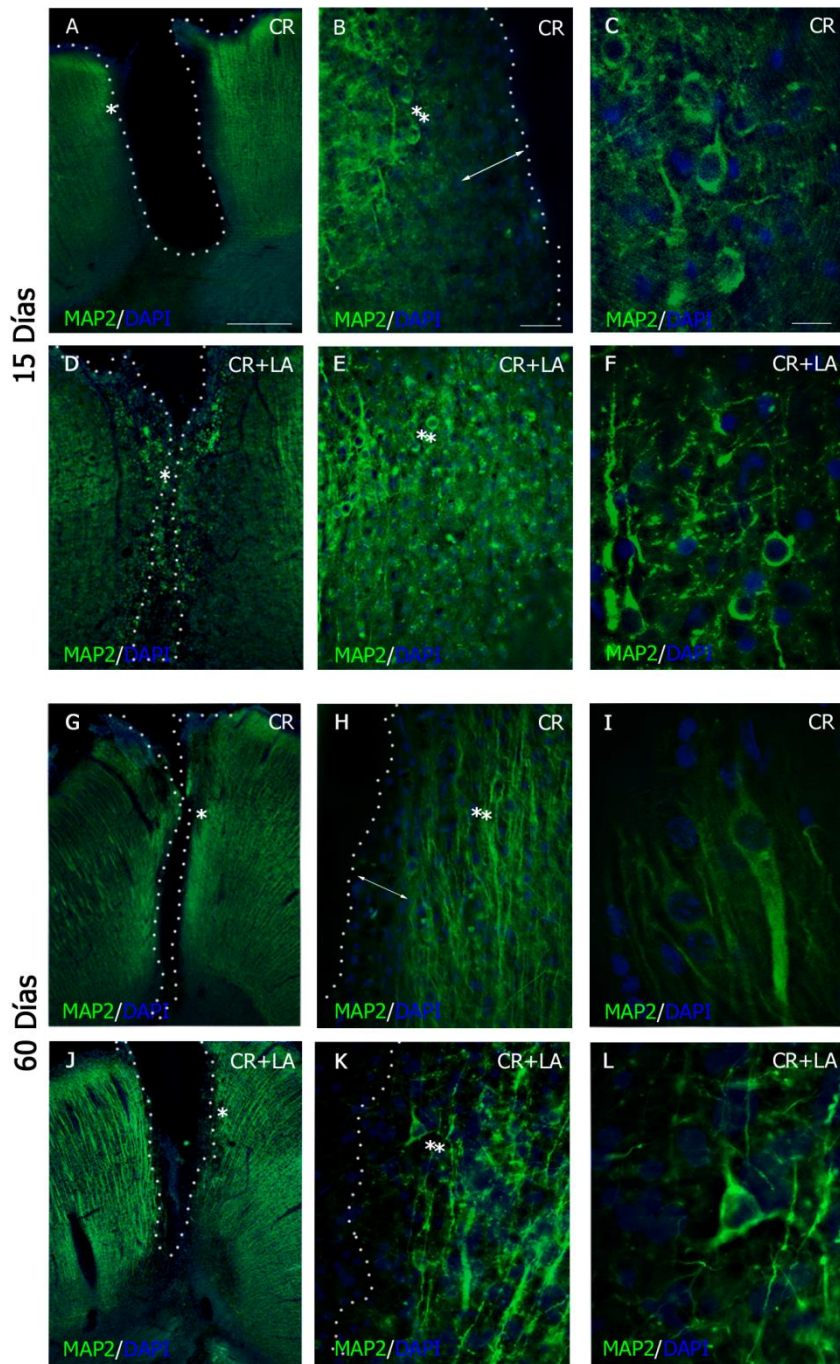


Fig.44. Inmunofluorescencia para MAP2 a los 15 y 60 días tras la CR. Se muestran imágenes de animales no tratados (A, B y C) y animales tratados con LA (D, E y F) del estudio realizado a corto plazo. También se muestran imágenes de animales no tratados (G, H e I) y animales tratados con LA (J, K y L) del estudio realizado a largo plazo. Siendo (F) una imagen magnificada de (E) correspondiente a los dos asteriscos y siendo (L) una imagen magnificada de (K) correspondiente a los dos asteriscos. Escala: (A, D, G y J): 100 μ m, (B, E, H y K): 50 μ m y (C, F, I y L): 20 μ m.

4. Estrategia de terapia celular y farmacológica tras daño celular por criolesión.

4.1. Caracterización histológica del área dañada

En esta parte del trabajo se pretende llevar a cabo un análisis *in vivo* del efecto del trasplante de BMDC tras el modelo de criolesión, comparando sus efectos con los observados tras el tratamiento con LA y realizar la evaluación del posible efecto sinérgico aplicando ambos tratamientos. Para ello, primero se realizó la caracterización histológica del área dañada.

En este caso, los resultados analizados son similares a los observados y desarrollados en el apartado 3. de resultados, puesto que la única modificación son las coordenadas utilizadas para la CR, debido a que en este caso trabajamos con ratones en lugar de ratas. Por tanto, de igual forma, la CR en el hemisferio derecho del ratón se realizó siguiendo el protocolo descrito por Quintana et al (Quintana et al., 2007). Con el objetivo de caracterizar la morfología de la lesión cortical se realizó la tinción de HE 8 días tras la CR.

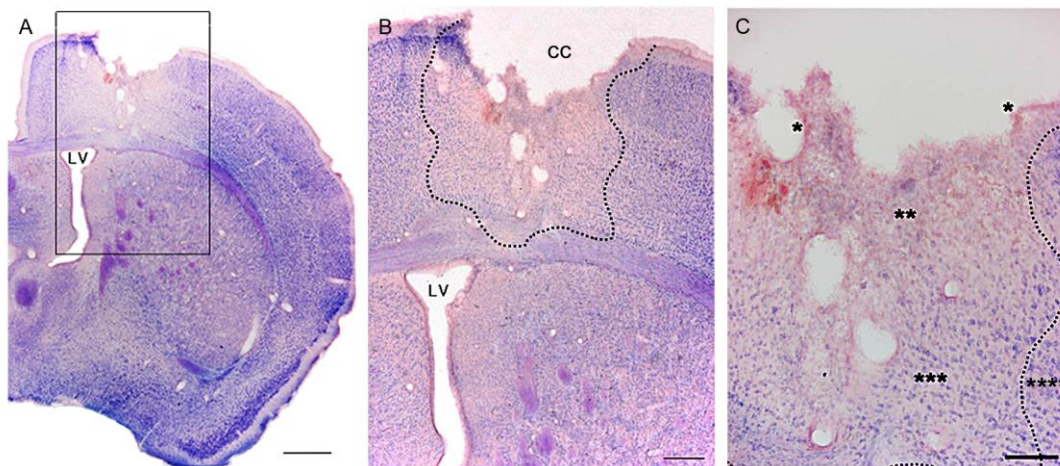


Fig.45. Caracterización histológica del área dañada en ratón. (A) Trauma cerebral focal tras el daño cortical inducido por frío en la proximidad del LV. (B) Magnificación del área dañada mostrando el daño primario delimitado por la CC y el daño secundario delimitado por la línea discontinua. (C) Imagen que muestra las tres áreas dañadas: un área de daño primario caracterizada por la presencia de la GS (un asterisco), una zona necrótica de daño secundario (dos asteriscos), una zona potencialmente afectada, correspondiente al área de penumbra (tres asteriscos) y una zona no afectada (cuatro asteriscos). Escala: (A) 500 μ m, (B) 200 μ m y (C) 100 μ m.

Al igual que en el estudio previo, en el hemisferio ipsilateral se localiza el daño primario caracterizado por la ausencia de parénquima cerebral delimitada por la CC (Figura 45 A). El daño se extiende por todo el tejido cerebral alterando la configuración de la capa cortical hasta el cuerpo estriado, dorsalmente al LV. Debido a los efectos criogénicos observamos mayores cambios característicos de daño cerebral secundario hasta el cuerpo calloso (línea discontinua en Figura 45 B).

En concordancia con el anterior estudio, en este caso también somos capaces de distinguir tres zonas muy delimitadas en los animales criolesionados no tratados. Una primera capa formada por la GS, circunscrita por toda la CC (un asterisco en Figura 45 C). Seguida a esta cicatriz es apreciable una zona de daño secundario (dos asteriscos en Figura 45 C) caracterizada por la relevante ausencia de núcleos celulares y un extenso espacio intercelular. Adyacente a esta zona encontramos una población de células potencialmente tratables para evitar la progresión del daño celular (tres asteriscos en Figura 45 C). Finalmente, seguido a este área nos encontramos con la zona intacta (cuatro asteriscos en Figura 45 C) compuesta por una densa población de tejido neural que no ha sufrido cambios significantes debido a la CR.

4.2. Presencia y distribución de las células derivadas de la médula ósea

Trascurridas 24h tras la CR, se trasplantaron un total de 5×10^6 BMDC GFP⁺ en cada cerebro utilizando las mismas coordenadas estereotáxicas empleadas para la CR. El análisis realizado 8 días tras la CR de todos los cerebros trasplantados con BMDC muestra una distribución diferente de éstas células trasplantadas entre animales criolesionados y animales controles (no criolesionados) (Figura 46).

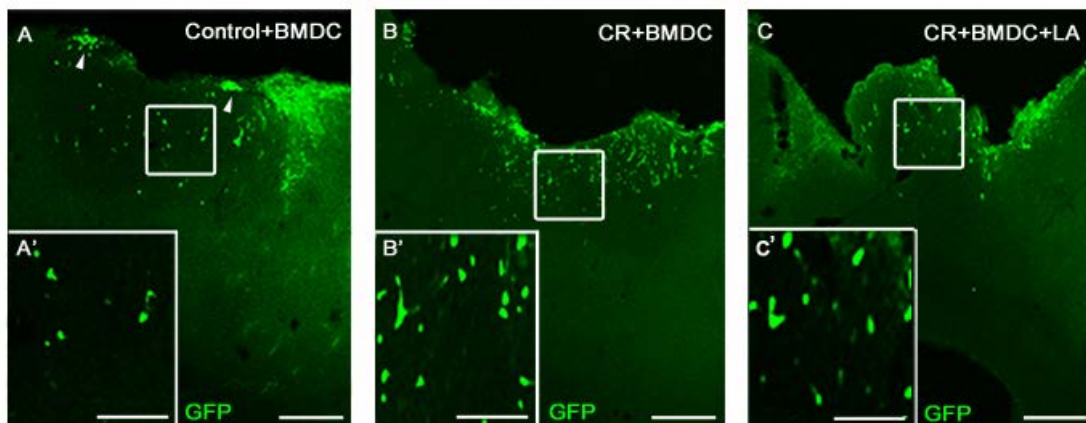


Fig.46. Distribución de las BMDC GFP⁺ trasplantadas en la zona lesionada 8 días tras la CR. (A) Control trasplantado sin criolesionar en el que se observa una pobre migración de las células y acumulaciones de estas en la zona superficial (cabezas de flechas). (B) Animales criolesionados trasplantados que presentan una distribución de las células principalmente alrededor del área dañada. (C) Animales trasplantados, criolesionados y tratados con LA donde las células también se extienden alrededor del área dañada. Una pequeña área fue seleccionada para mostrar la morfología de las células trasplantadas. (A') Imagen magnificada de (A) correspondiente al cuadrado. (B') Imagen magnificada de (B) correspondiente al cuadrado. (C') Imagen magnificada de (C) correspondiente al cuadrado. Total de células GFP⁺ en todos los animales trasplantados de cada grupo de estudio: 1308 ± 1289 en el control+BMDC, 2740 ± 1631 en CR+BMDC y 1993 ± 922 en CR+BMDC+LA. Porcentaje de las células GFP⁺ en todos los animales trasplantados de cada uno de los grupos, considerando el control + BMDC como el 100%: 209% para CR+BMDC y 152% para CR+BMDC+LA. Escala: (A, B y C) 75 μ m, (A', B' y C') 35 μ m.

En los animales controles se observa una migración reducida de las células GFP⁺ a través de lparénquima cortical alrededor del sitio de inyección. Además, en el área cortical de estos animales se identifican pequeñas agregaciones de BMDC (cabezas de flecha en Figura 46 A) mostrando su tendencia a unirse entre sí que podría llevar a esta pobre capacidad de migración. Por otra parte, en los animales criolesionados trasplantados con BMDC las células GFP⁺ se concentran alrededor de la zona lesionada guiándose hacia la CC (Figura 46, B y C).

Con el fin de cuantificar el ratio de supervivencia de las BMDC 8 días tras la CR, se determinó el número total de células en todos los animales trasplantados. En torno al área dañada, concretamente alrededor de 100 µm desde la CC, encontramos un 1,4 % (2013,9 ± 1281,1) del número total de células trasplantadas 8 días tras la CR y no encontramos ninguna diferencia en la supervivencia de estas células entre los grupos experimentales y el grupo control. Sin embargo, estos datos se deben interpretar de manera cautelosa puesto que como hemos comentado, en el grupo control se encontraron agregaciones celulares que podrían dar lugar a una sobrestimación del número real de células.

Por último, se analizó la presencia de estas células 16 días tras la CR, pero no detectamos células GFP⁺ en ninguno de los animales trasplantados.

4.3. Análisis del efecto del tratamiento celular y farmacológico en la muerte celular

Las observaciones realizadas en diferentes estudios demuestran que en numerosas ocasiones las células trasplantadas mueren en un corto período de tiempo, pero sin embargo el beneficio y la recuperación tisular continúan, mostrando por lo tanto que la permanencia limitada de las células trasplantadas tiene igualmente un efecto positivo, debido probablemente a la modificación de otros factores.

Consistente con estas observaciones, en el estudio realizado a los 6 días tras la CR se observa una gran densidad de células GFP⁺ trasplantadas (Figura 47 A y B) que sin embargo disminuye drásticamente en los animales analizados a los 8 días tras la CR (Figura 47 C y D). Finalmente, a los 16 días tras la CR no se detecta ninguna célula GFP⁺. Estas observaciones coinciden con el análisis realizado de la muerte celular a los 8 días tras la CR mediante la determinación de la Caspasa 3 total y activa que es una molécula fundamental en un proceso de apoptosis. Pues se observa la presencia de esta caspasa 3 activada, parcial o totalmente responsable de la escisión proteolítica de muchas proteínas clave, tan solo en los grupos de animales trasplantados, corroborando que estas células GFP⁺ podrían estar muriendo en este punto (Figura 47 E).

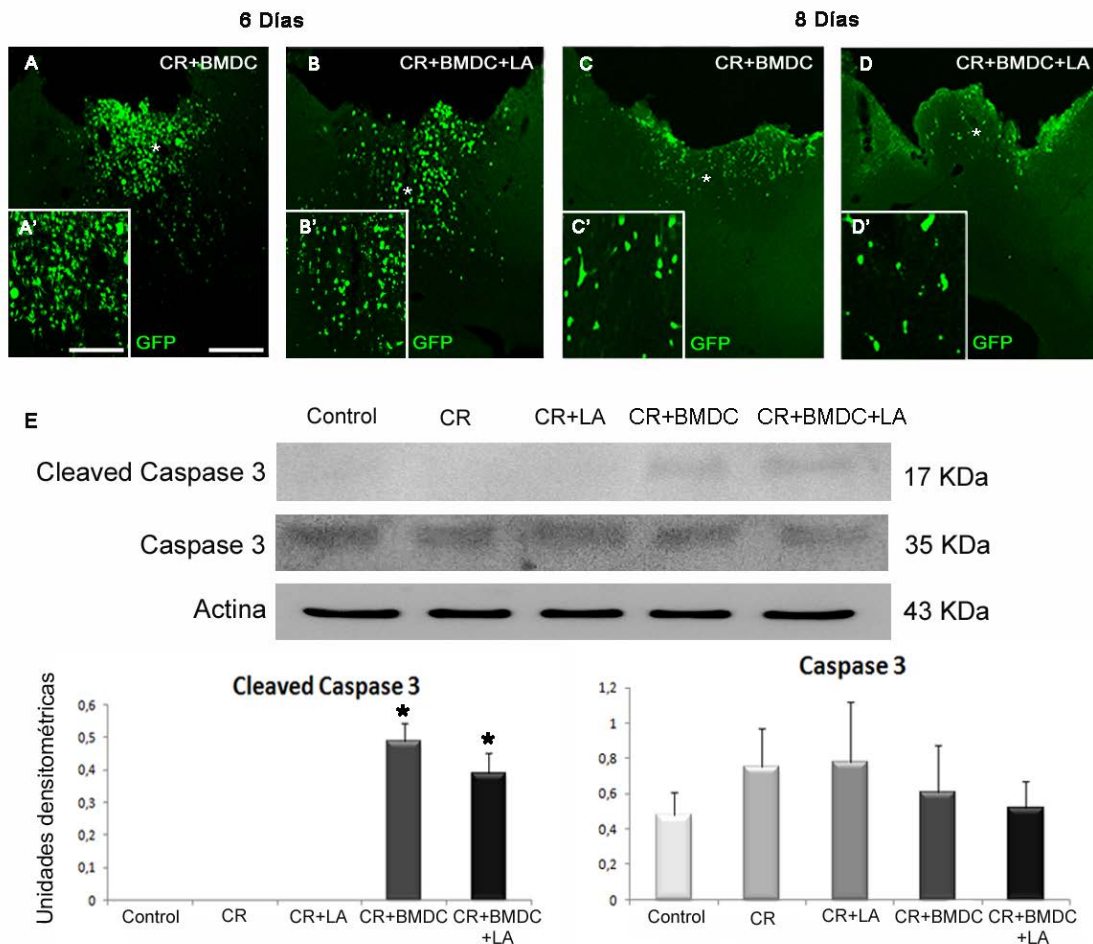


Fig.47. Análisis de la muerte celular tras tratamiento celular y farmacológico. (A y B) Distribución de las BMDC GFP⁺ trasplantadas en la zona lesionada de los grupos tratados con BMDC y LA y sacrificados 6 días tras la CR y (C y D) de los mismos grupos sacrificados 8 días tras la CR. (E) Imagen de western blot para Caspase 3 cleaved y caspase 3, junto con su cuantificación en unidades de densidad en animales sacrificados 8 días tras la CR. Escala: (A, B, C y D) 75 μ m, (A', B', C' y D') 35 μ m. * $p < 0,05$.

4.4. Determinación de la presencia de células nuevas en el área dañada

Con el fin de determinar el proceso de proliferación celular tanto en el área dañada como en el área de penumbra, se determinó el número de células en fase S tras aplicar de forma intraperitoneal inyecciones de BrdU el tercer día tras realizar la CR y durante cinco días consecutivos. Los animales se sacrificaron un día tras la última dosis de BrdU. El número total de células BrdU⁺ encontradas en el área dañada en todos los grupos experimentales se analizaron 8 días tras la CR. La inmunohistoquímica para BrdU muestra que las células BrdU⁺ del grupo control se localizan solo superficialmente en la proximidad de las meninges (Figura 48 A), sin embargo en el resto de grupos experimentales las células BrdU⁺ se encuentran localizadas más profundamente, en el tejido neural, pudiendo indicar su activa proliferación dentro del área dañada, sin descartar la posibilidad de la llegada de nuevas células de las áreas colindantes (Figura 48 B - E).

El análisis estadístico, muestra un aumento significativo en la densidad de células BrdU⁺ expresadas como un ratio respecto a los valores de los controles (número de células BrdU⁺ de cada grupo/número de células BrdU⁺ del grupo control). Los resultados obtenidos muestran un incremento de 3,9 veces en el grupo criolesionado (CR) ($p < 0,05$), incremento que es incluso más elevado para cada uno de los grupos tratados: 7,8 veces en el grupo criolesionado y tratado con lipoico (CR+LA) ($p < 0,001$), 7,9 veces en el grupo criolesionado y trasplantado con BMDC (CR+BMDC) ($p < 0,001$) y 12,6 veces en el grupo criolesionado y tratado con lipoico así como también trasplantado con BMDC (CR+BMDC+LA) ($p < 0,001$) comparado con el grupo control (Control: 694 ± 422 células/mm²). Además, los resultados demuestran un incremento significativo ($p < 0,01$) en los grupos tratados individualmente con LA o BMDC (CR+LA y CR+BMDC, respectivamente) que es incluso más evidente ($p < 0,001$) en el grupo tratado con la terapia combinada (CR+BMDC+LA) cuando se compara con los animales criolesionados (CR). Este grupo con terapia combinada (CR+BMDC+LA) presenta un incremento estadísticamente significativo en la densidad de las células BrdU⁺ comparado con los grupos CR+BMDC y CR+LA ($p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente) (Figura 48 Gráfico).

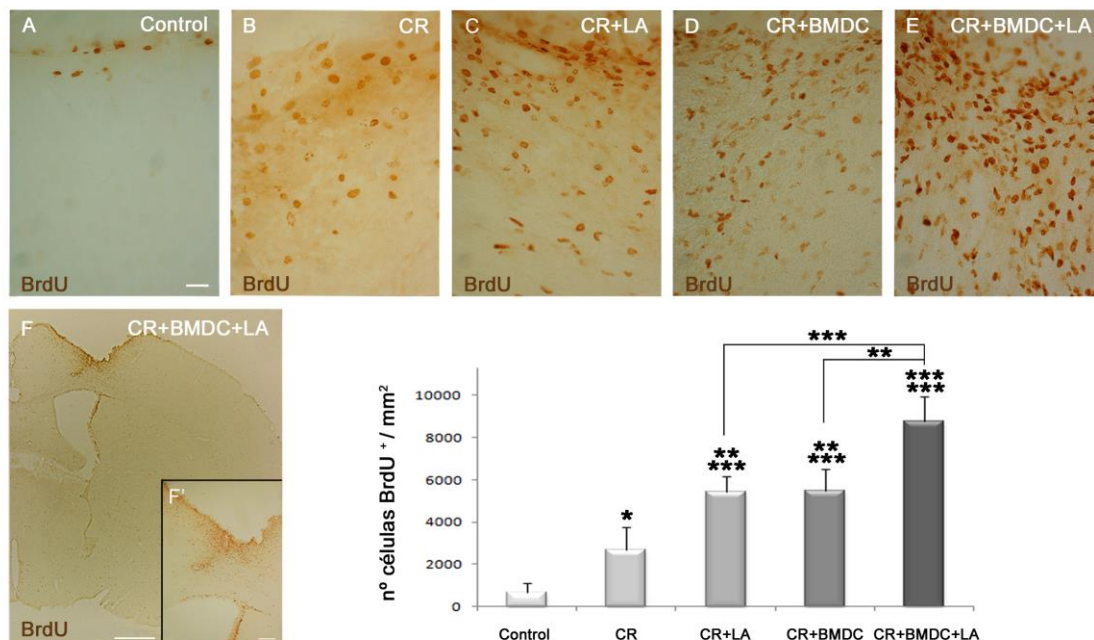


Fig.48. Presencia de células nuevas en el área lesionada 8 días tras la CR. (A-E) Microfotografías de las células BrdU⁺ marcadas mediante inmunohistoquímica con DAB mostrando un incremento en la proliferación en animales tratados que es más evidente en el grupo de terapia combinada (CR+BMDC+LA). (F y F') Vista panorámica del hemisferio dañado de animales tratados con BMDC y LA. (Gráfico) El gráfico muestra la cuantificación de la densidad de las células BrdU⁺ (número de células/mm²) en las primeras 100 µm del área dañada. Escala: (A-E) 10 µm, (F) 500 µm, (F') 50 µm. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Por otra parte, este incremento de células en proliferación tiene un carácter local puesto que las células BrdU⁺ se encuentran solo en la zona adyacente al área dañada (Figura 48 F y F'). Por tanto, todos estos resultados sugieren que la CR estimula la proliferación celular local la cual incrementa significativamente cuando se aplica una terapia farmacológica (LA) y/o

células (BMDC). El número de estas células nuevas incrementa drásticamente en combinación con estas dos terapias.

4.5. Caracterización molecular de las células nuevas

Con el fin de caracterizar las nuevas células presentes en el área dañada tras tratamiento, se realizó una doble inmunohistoquímica de fluorescencia para diferentes marcadores neurales junto con el marcador BrdU, el cual nos indicaba la reciente formación de esas células presentes en torno a la zona dañada.

Cualitativamente, los estudios de colocalización de BrdU/CollIV (Figura 49 A - D), BrdU/GFAP (Figura 49 E - H) y BrdU/Iba1 (Figura 49 I - L) muestran que las nuevas células formadas CollIV^+ y GFAP^+ se incorporan en la formación de nuevos vasos sanguíneos y la red capilar respectivamente. Estos descubrimientos sugieren que las nuevas células formadas participan activamente en la recuperación y reorganización de los nuevos vasos sanguíneos dentro del área dañada en todos los grupos tratados. Por otra parte, se observan células $\text{BrdU}^+/\text{Iba1}^+$ indicando la contribución de las nuevas células en la subpoblación de células de microglía, las cuales podrían participar en la fagocitosis de desechos y células muertas encontradas en el parénquima cerebral dañado.

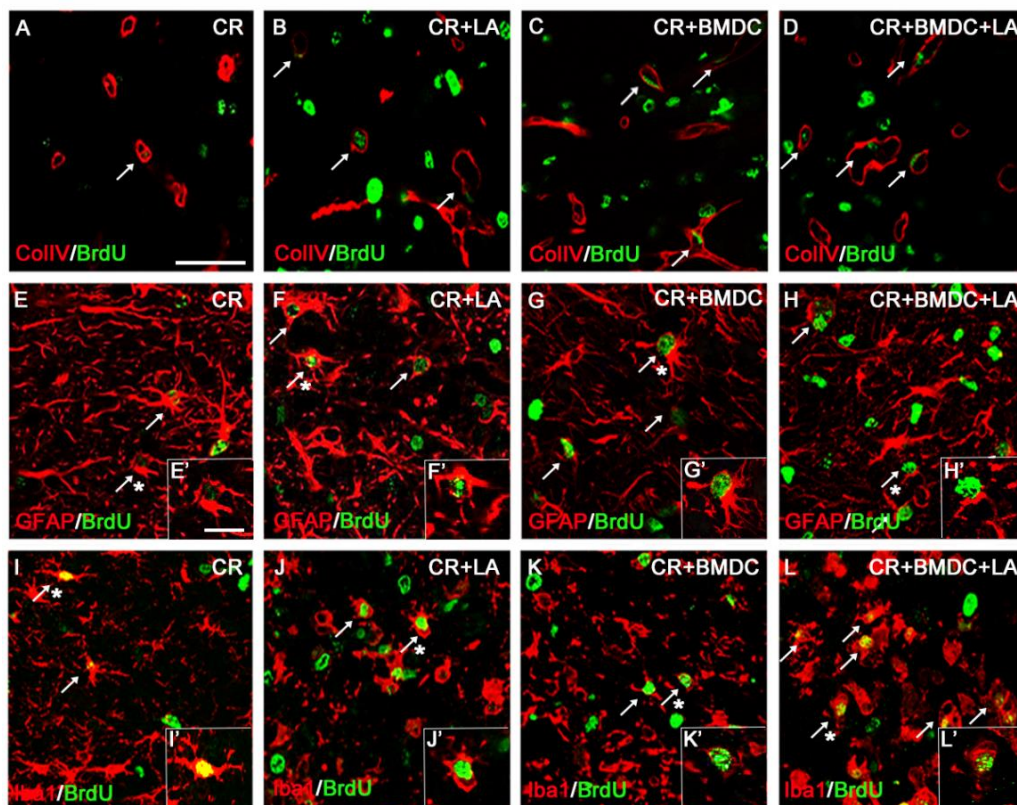


Fig.49. Caracterización molecular de las nuevas células encontradas tras el tratamiento farmacológico y celular en el área lesionada 8 días tras la CR. Co-localización en los animales criolesionados y los animales tratados con LA, BMDC y BMDC + LA de las células BrdU y (A-D) el marcador endotelial Collagen IV, (E-H) el marcador astrogial GFAP y (I-L) el marcador microglial Iba1. Las flechas muestran células doble positivas. (E-L') Imagen magnificada de (E-L) correspondiente al asterisco. Escala: (A-L) 100 μm , (E'-L') 50 μm .

Por otra parte, la cuantificación de la colocalización celular evaluada como el porcentaje de células doble positivas, confirma un incremento de células BrdU⁺/Col IV⁺ en todos los grupos tratados CR+LA, CR+BMDC y CR+BMDC+LA ($p < 0,001$) cuando comparamos con animales criolesionados (CR). Además, la colocalización de células BrdU⁺/Iba1⁺ se ve incrementada de manera significativa en el grupo tratado individualmente con BMDC (CR+BMDC) ($p < 0,01$) e incluso más elevada en el grupo con terapia combinada (CR+BMDC+LA) ($p < 0,001$) cuando comparamos con grupos criolesionados. Encontramos un incremento significativo en la colocalización celular de estas células entre el grupo CR+BMDC+LA y el grupo CR+LA ($p < 0,001$), así como entre los grupos CR+BMDC+LA y CR+BMDC ($p < 0,01$). Finalmente, no se observan diferencias significativas en la colocalización de células BrdU⁺/GFAP⁺ entre ninguno de los grupos experimentales (Figura 50).

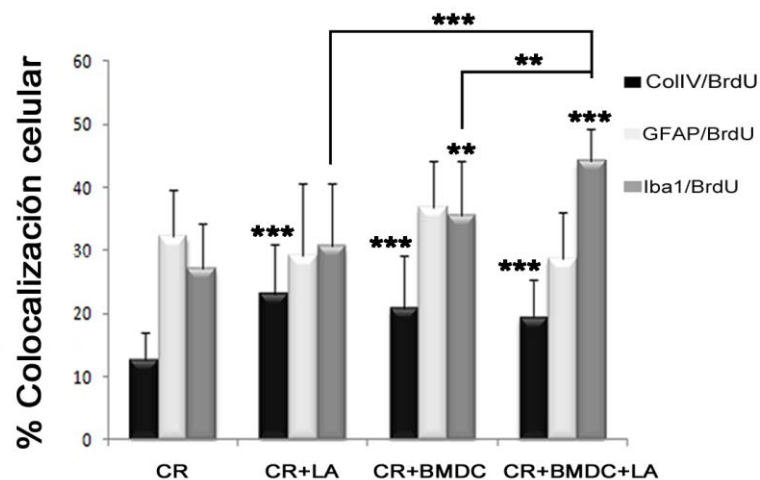


Fig.50. Gráfico que muestra la cuantificación en el área lesionada de la colocalización celular (% de colocalización celular) en cada uno de los grupos experimentales. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

4.6. Análisis del efecto del tratamiento celular y farmacológico en la cuantificación y distribución glial

4.6.1 Análisis del efecto del tratamiento celular y farmacológico en la cuantificación y distribución astrogliar

Tal y como se ha comentado a lo largo de este trabajo, uno de los principales obstáculos para la regeneración axonal y recuperación funcional tras el daño del SNC adulto es la formación de la GS (Fitch and Silver, 2008, Kawano et al., 2012, Rocamonde et al., 2012). Con el objetivo de evaluar la presencia de la subpoblación astrogliar se realizó una inmunohistoquímica del marcador molecular específico de astrocitos, GFAP.

La administración de LA, BMDC o ambos resulta en una disminución de la GS alrededor del área dañada 8 días tras la CR (Figura 51 C - E). Se observa una distribución aleatoria de los astrocitos en el área dañada, nunca formando grupos de células o una GS que impide la penetración de neuritas en regeneración en el SNC lesionado. Es interesante remarcar como en estos animales se observan brotes de tejido nuevo formado dirigido hacia la CC (asteriscos en Figura 51 C - E), sugiriendo que se lleva a cabo un mecanismo de recuperación mediante la repoblación del área dañada. Por otra parte, la GS está presente en el grupo criolesionado (flechas en Figura 51 B), delimitando claramente el tejido dañado alrededor de toda la CC sin observar por lo tanto ninguna extensión de tejido hacia esta cavidad.

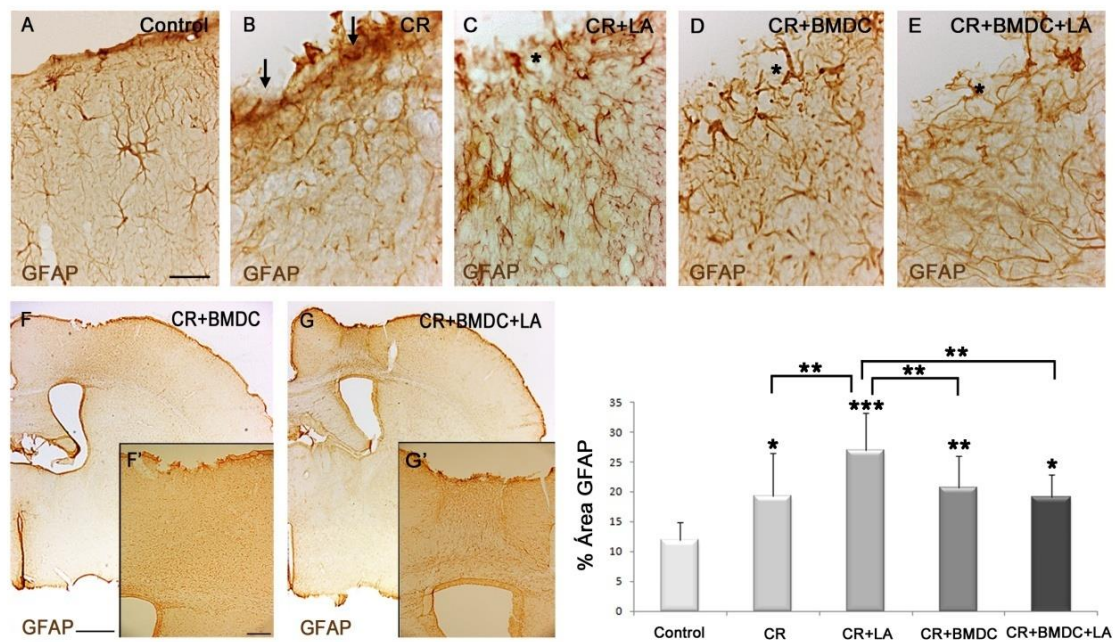


Fig.51. Presencia de astrocitos tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 8 días tras la CR. (A-E) Microfotografías de las células GFAP⁺ marcadas mediante inmunohistoquímica con DAB mostrando la formación de la GS en los animales criolesionados no tratados (flechas en B) y las extensiones hacia la CC de tejido nuevo en los tres grupos tratados (asteriscos en C-E). (F y F') Vista panorámica del hemisferio dañado de los animales tratados con BMDC. (G y G') Vista panorámica del hemisferio dañado de los animales tratados con BMDC y LA. (Gráfico) El gráfico muestra la cuantificación del área ocupada por los astrocitos (% área GFAP) en las primeras 100 μm del área dañada en cada uno de los grupos experimentales. Escala: (A-E) 10 μm, (F y G) 500 μm, (F' y G') 50 μm. * p<0,05; ** p<0,01 y *** p<0,001.

Para llevar a cabo la cuantificación astrogliar, evaluamos el porcentaje de superficie ocupada por los astrocitos en las 100 primeras micras desde el límite del daño 8 días tras la CR en todas las secciones coronales de todos los grupos experimentales y en el área correspondiente del grupo control. Se observa un incremento significativo en el grupo CR (p<0,05), CR+BMDC (p<0,01) y CR+BMDC+LA (p<0,05) cuando se compara con animales controles. Además, este área fue significativamente mayor (p<0,01) en el grupo CR+LA comparado con los grupos CR, CR+BMDC y CR+BMDC+LA (Figura 51 Gráfico).

Con el fin de analizar el desarrollo en el tiempo del nuevo tejido formado y la GS en animales criolesionados y animales controles, realizamos el mismo estudio inmunohistoquímico 16 días tras la CR (Figura 52).

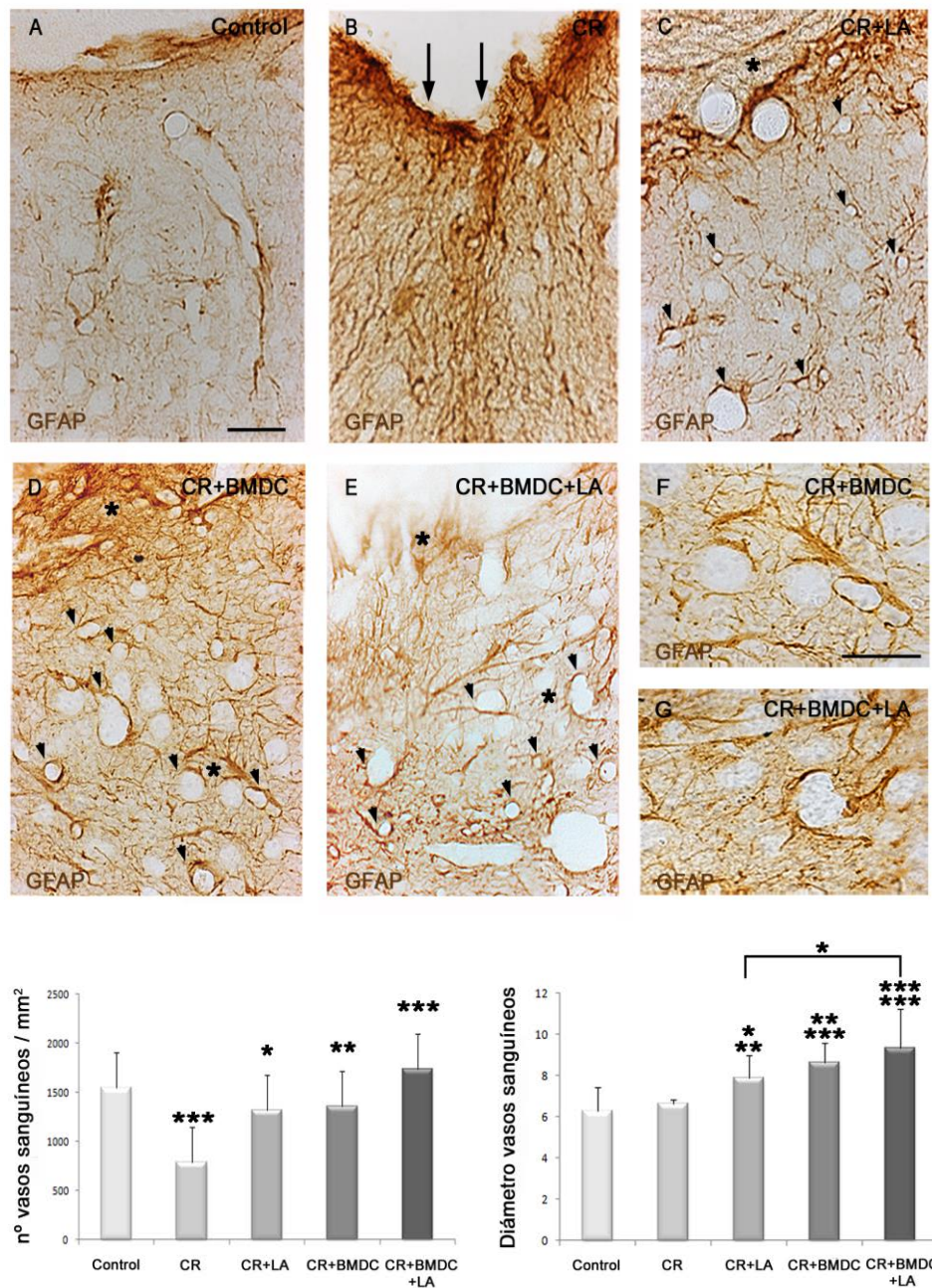


Fig.52. Presencia de astrocitos tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada de animales sacrificados 16 días tras la CR. (A-E) Microfotografías de las células GFAP⁺ reveladas con DAB mostrando la consolidación de la GS en los animales criolesionados no tratados (flechas en B) y las extensiones de nuevo tejido formado hacia la CC en los tres grupos tratados (asteriscos en C-E). Véanse las células GFAP⁺ alrededor de los vasos sanguíneos en los tres grupos tratados (cabezas de flecha en C-E). (F) Imagen magnificada de (D) correspondiente al asterisco. (G) Imagen magnificada de (E) correspondiente al asterisco. (Gráficos) Los gráficos muestran la cuantificación del nº de vasos sanguíneos/mm² y el diámetro de los vasos sanguíneos en las primeras 100 µm del área dañada. Escala: (A-G) 20 µm. * p<0,05; ** p<0,01 y *** p<0,001.

No solo no se observa una aparición tardía de la GS en todos los grupos tratados, sino que además las células GFAP⁺ se localizan dentro del nuevo parénquima neural formado. Además, se observa una disminución astrogliol en todos los grupos tratados comparado con los mismos grupos 8 días tras la CR, sugiriendo que se produce una reducción de la actividad glial aguda (Figura 52 C - E). Es también importante resaltar como en los tres grupos tratados, las células GFAP⁺ se localizan alrededor de los vasos sanguíneos dentro del área dañada, sugiriendo su papel en la recuperación de la BHE (cabezas de flecha en Figura 52 C - G). Por otra parte, la GS persiste e incluso se muestra más marcada en el grupo criolesionado (flechas en Figura 52 B), mientras que en el grupo control se observa una distribución normal de los astrocitos (Figura 52 A).

4.6.2 Análisis del efecto del tratamiento celular y farmacológico en la cuantificación y distribución microglial

Para evaluar la subpoblación de células microgliales realizamos estudios de inmunohistoquímica para marcadores como el marcador molecular específico Iba1 8 días tras la CR. Se observa un incremento de las células de microglía en los grupos tratados (Figura 53 C - E) cuando comparamos con los grupos no tratados (Figura 53 A y B). Además, este incremento tiene un carácter local pues solo encontramos células Iba1⁺ en la zona que rodea el área dañada (Figura 53 F, F', G y G').

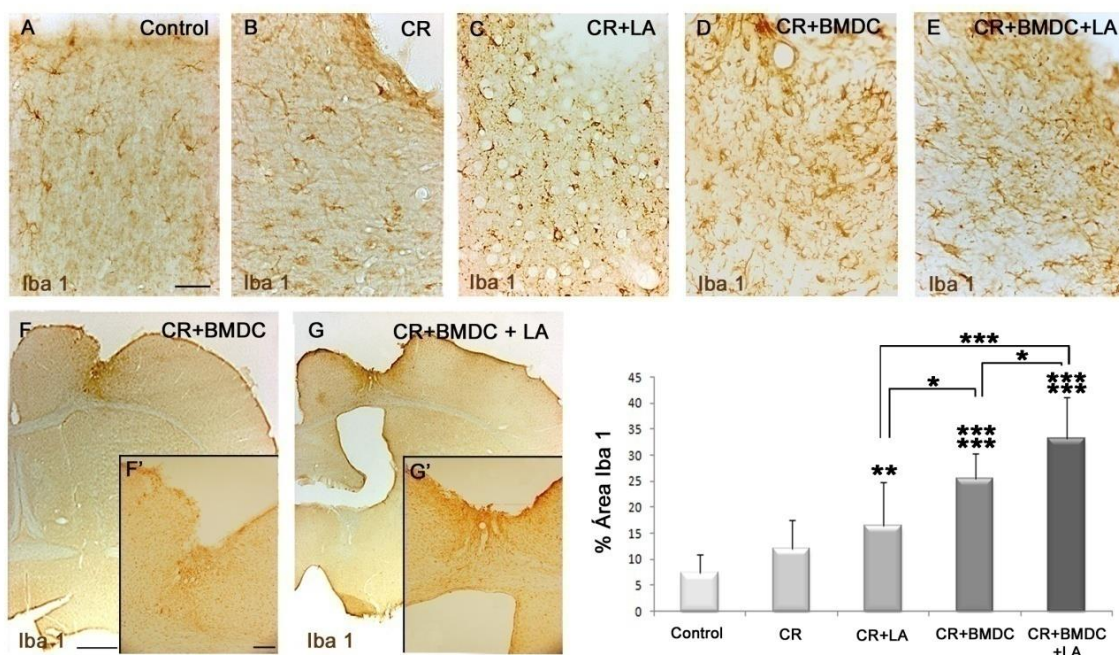


Fig.53. Presencia de microglía tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 8 días tras la CR. (A-E) Microfotografías de células Iba 1⁺ reveladas con DAB mostrando un incremento en el área ocupada por esta microglía en los animales tratados. (F y F') Vista panorámica del hemisferio dañado de animales tratados con BMDC. (G y G') Vista panorámica del hemisferio dañado de animales tratados con BMDC y LA. (Gráfico) El gráfico muestra la cuantificación del área dañada ocupada por la microglía (% del área de Iba 1) en las primeras 100 µm de cada uno de los grupos experimentales. Escala: (A-E) 10 µm, (F y G) 500 µm, (F' y G') 50 µm. * p<0,05; ** p<0,01 y *** p<0,001.

Con el objetivo de cuantificar la microglía y analizar su distribución, primero se evaluó el porcentaje de superficie ocupada por las células Iba 1⁺ en todas las secciones coronales que presentaban CR en las 100 primeras micras desde el límite de la lesión 8 días tras la CR y el área representativa en todos los animales controles. Se observa un incremento significativo en CR+LA ($p<0,01$), CR+BMDC y CR+BMDC+LA ($p<0,001$) cuando se compara con los animales controles. Además, este área es significativamente mayor ($p<0,001$) en los grupos CR+BMDC y CR+BMDC+LA comparado con el grupo CR. Este incremento es también significativo ($p<0,05$; $p<0,001$) en el grupo CR+BMDC+LA comparado con el grupo CR+BMDC y CR+LA respectivamente. Además, estos datos son significativamente prominentes ($p<0,05$) en el grupo CR+BMDC cuando comparamos con el grupo CR+LA (Figura 53 Gráfico).

Con la perspectiva de analizar el desarrollo cronológico de la microglía en todos los grupos experimentales, se realizó el mismo estudio inmunohistoquímico para Iba1 16 días tras la CR. Aparentemente, se advierte la misma densidad de células Iba1⁺ en todos los grupos tratados y el grupo control (Figura 54 A y C - E) pero sin embargo, se observa un incremento con el grupo criolesionado (Figura 54 B). Además, no se encuentran agregaciones de células microgliales en la zona adyacente al área dañada, sino que las células están distribuidas de manera homogénea dentro del parénquima cortical (Figura 54 F, F', G y G').

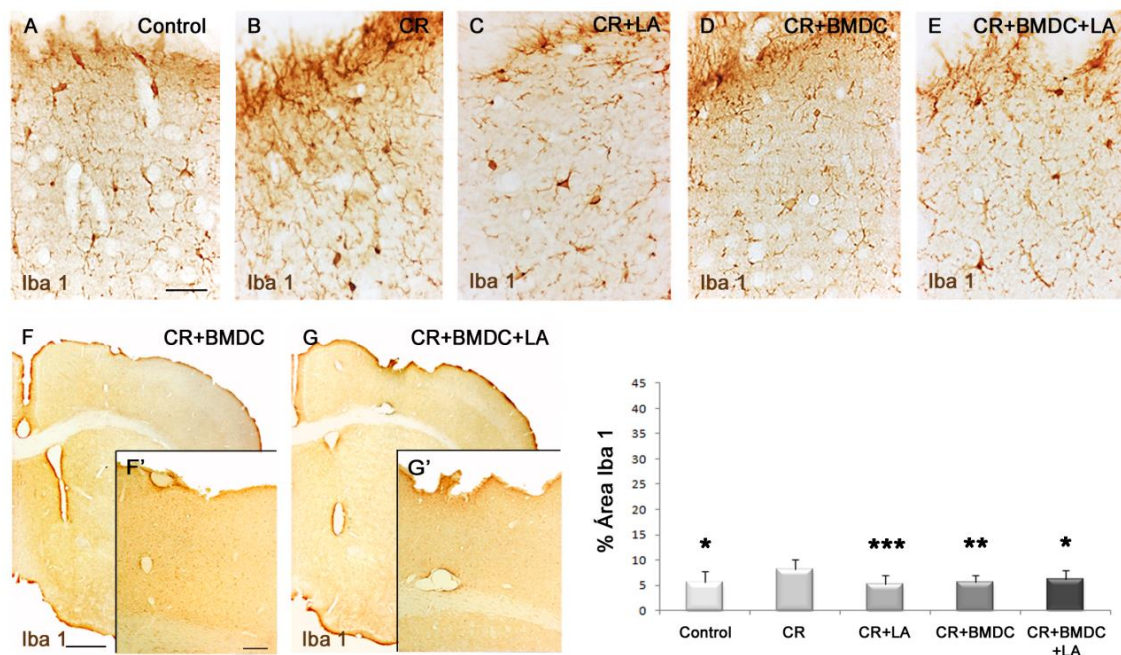


Fig.54. Presencia de microglía tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 16 días tras la CR.

(A-E) Microfotografías de células Iba 1⁺ reveladas con DAB mostrando una disminución en el área ocupada por esta microglía en los animales tratados alcanzando niveles similares a los controles. (F y F') Vista panorámica del hemisferio dañado de animales tratados con BMDC. (G y G') Vista panorámica del hemisferio dañado de animales tratados con BMDC y LA. (Gráfico) El gráfico muestra la cuantificación del área ocupada por la microglía (% del área de Iba 1) en las primeras 100 μm dentro del área dañada en cada uno de los grupos experimentales. Escala: (A-E) 10 μm , (F y G) 500 μm y (F' y G') 50 μm . * $p<0,05$; ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$.

Para cuantificar la microglía en este punto se evaluó el porcentaje de superficie ocupada por estas células en las 100 primeras micras desde el límite del daño de todas las

secciones coronales que presentaban CR y en el área correspondiente del grupo control. Se observa una disminución significativa en el grupo CR+LA ($p < 0,001$), CR+BMDC ($p < 0,01$) y una disminución significativa en los grupos CR+BMDC+LA y el grupo control ($p < 0,05$) cuando se compara con animales criolesionados (Figura 54 Gráfico).

4.7. Determinación de la presencia de citoquinas y factores neurotróficos en el área dañada tras el tratamiento celular y farmacológico

La función beneficiosa de la microglía está relacionada con la función de fagocitosis que involucra la supervivencia neuronal (Petersen and Dailey, 2004, Shaked et al., 2004, Mitrasinovic et al., 2005), mientras que la función perjudicial se asocia a la secreción de citoquinas proinflamatorias (Graeber and Streit, 2010). Entre estas encontramos el NF κ B, un importante factor de transcripción para la inducción de mediadores inflamatorios que participa en la neuroinflamación mediada por la microglía (Jayasooriya et al., 2011, Gao et al., 2013a, Kim et al., 2013). Varios estudios sugieren que la expresión de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y citoquinas proinflamatorias como TNF α o IL-1 β es controlada por la activación de NF κ B (Jung et al., 2010, Liu et al., 2011a, Chantong et al., 2012, Zhu et al., 2012).

Por tanto, nuestro próximo objetivo es analizar si los aumentos de células de microglía encontrados en los animales tratados a los 8 días tras las CR se asocian con un aumento de factores proinflamatorios como NF κ B o TNF α en este punto, no observando diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos del estudio para el caso del NF κ B (Figura 55).

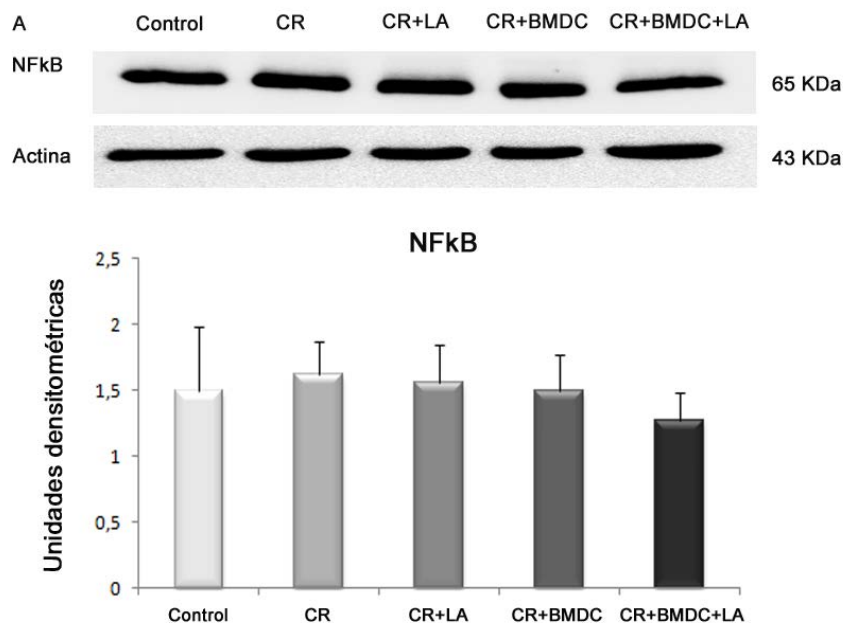


Fig.55. Presencia de NF κ B tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 8 días tras la CR. (A) Imagen del western blot para NF κ B en cada grupo experimental no mostrando diferencias significativas entre ellos. (Gráfico) El gráfico muestra la cuantificación de la densidad de las bandas (expresado como el ratio de NF κ B /Actina) en cada uno de los grupos experimentales.

En cuanto al TNF α , solo se observa un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) para el caso del grupo tratado con LA y BMDC comparado con el grupo control (Figura 56).

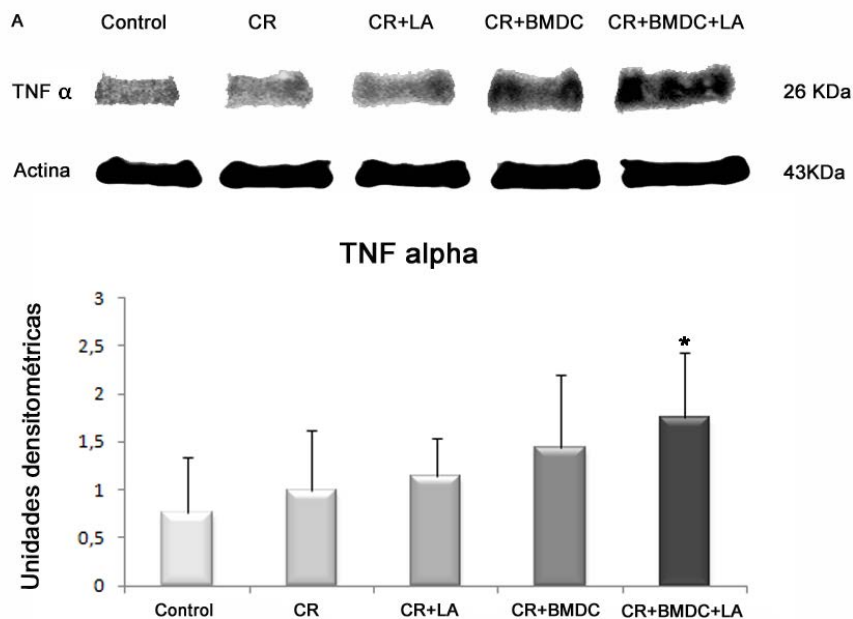


Fig.56. Presencia de TNF α tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 8 días tras la CR. (A) Imagen del western blot para TNF α en cada grupo experimental mostrando el incremento en los niveles de esta proteína en animales tratados con BMDC y LA. (Gráfico) El gráfico muestra la cuantificación de la densidad de las bandas (expresado como el ratio de TNF α /Actina) en cada uno de los grupos experimentales. * $p < 0,05$.

Por otra parte, ha sido mostrado como el factor neurotrófico BDNF mediado por las células microgliales u secretado por CMM provoca rápidos potenciales de acción que influyen la excitabilidad neuronal modulando tareas de aprendizaje y memoria (Fossati et al., 2004, Nacmias et al., 2004). Debido al importante papel neuroprotector de esta proteína decidimos investigar su expresión en las diferentes condiciones de estudio.

Los resultados de la cuantificación por densitometría de western blot muestran un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de la proteína BDNF en los animales tratados (CR+LA, CR+BMDC y CR+BMDC+LA) comparado con los criolesionados no tratados y los controles (CR y control), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos tratados (Figura 57).

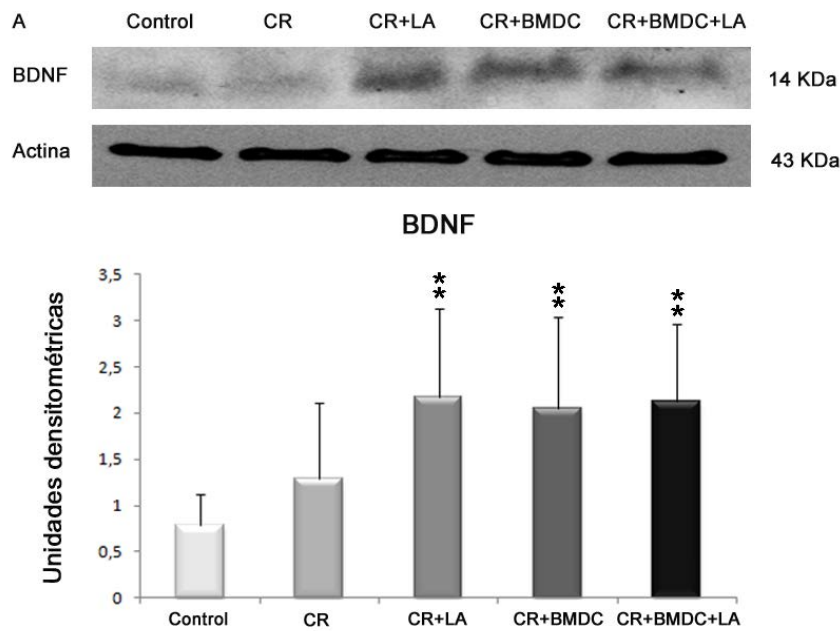


Fig.57. Presencia de BDNF tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 8 días tras la CR. (A) Imagen del western blot para BDNF en cada grupo experimental mostrando el incremento en los niveles de esta proteína en todos los animales tratados. (Gráfico) El gráfico muestra la cuantificación de la densidad de las bandas (expresado como el ratio de BDNF/Actina) en cada uno de los grupos experimentales. * $p < 0,05$.

4.8. Estudio angiogénico tras el tratamiento celular y farmacológico

Con el objetivo de evaluar la presencia de vasos sanguíneos, realizamos una inmunohistoquímica para la proteína Colageno IV. En animales no tratados los vasos sanguíneos presentan una distribución arbitraria alrededor del área dañada (Figura 58 A y B). Sin embargo, los vasos sanguíneos de los animales tratados adquieren una aparente disposición paralela orientados hacia la CC y la lesión cerebral (Figura 58 C-E). Asimismo, esta distribución paralela permanece de la misma forma en toda el área dañada, y no solo concentrada alrededor de la CC (Figura 58 F, F', G y G').

Además, la cantidad y el diámetro de los vasos sanguíneos en los animales tratados parece ser mayor. Por tanto, con el objetivo de analizar este tejido cuantificamos el área ocupada por los vasos sanguíneos 8 días tras la CR (Figura 58 Gráfico). Se observa un aumento significativo del área ocupada por los vasos sanguíneos en los tres grupos tratados comparado con los animales no tratados. Específicamente, se observa un incremento significativo ($p < 0,01$) en el grupo tratado con LA (CR+LA) y el grupo con tratamiento combinado (CR+BMDC+LA) en relación con el grupo control y el grupo criolesionado (Control y CR). Además, se obtiene un incremento significativo ($p < 0,001$) en animales CR+BMDC comparados con animales controles y animales criolesionados.

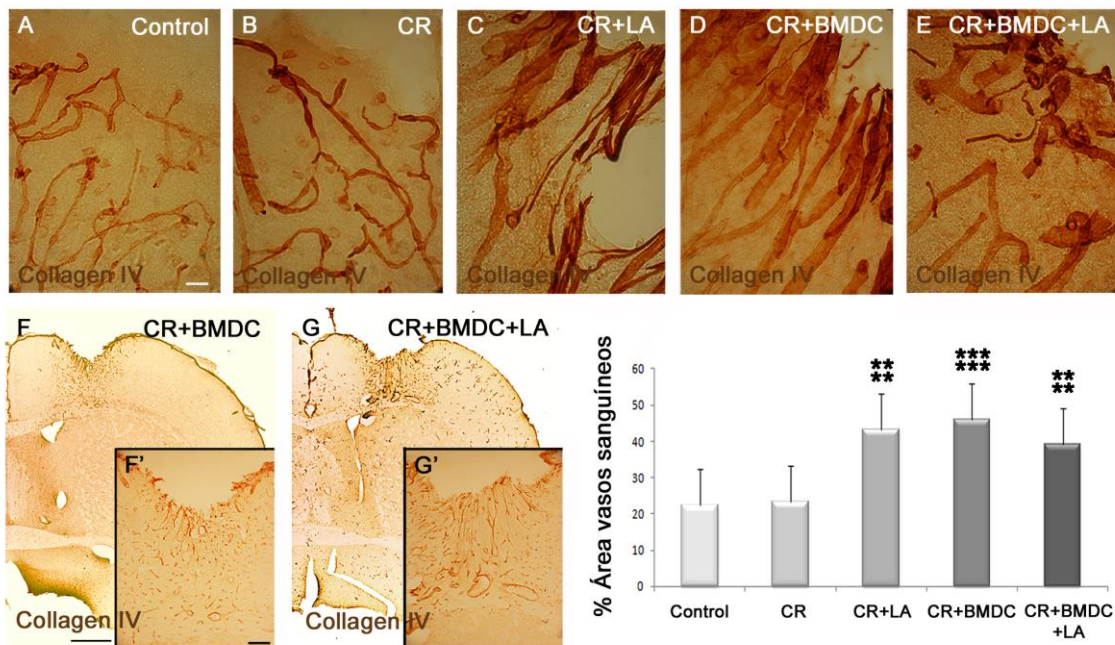


Fig.58. Angiogénesis tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 8 días tras la CR. (A-E) Microfotografías de células Collagen IV⁺ reveladas con DAB mostrando la presencia y distribución de los vasos sanguíneos siendo esta más organizada para el caso de los animales tratados. Véase la orientación paralela hacia la CC en el tejido de penumbra. (F y F') Vista panorámica del hemisferio dañado de animales tratados con BMDC. (G y G') Vista panorámica del hemisferio dañado de animales tratados con BMDC y LA. (Gráfico) El gráfico muestra la cuantificación del área ocupada por los vasos sanguíneos (% área vasos sanguíneos). Escala: (A-E) 10 μ m, (F y G) 500 μ m, (F' y G') 50 μ m. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

La técnica de western blot para COL4A2 se realizó para verificar el efecto angiogénico del tratamiento celular y farmacológico (Figura 59 A).

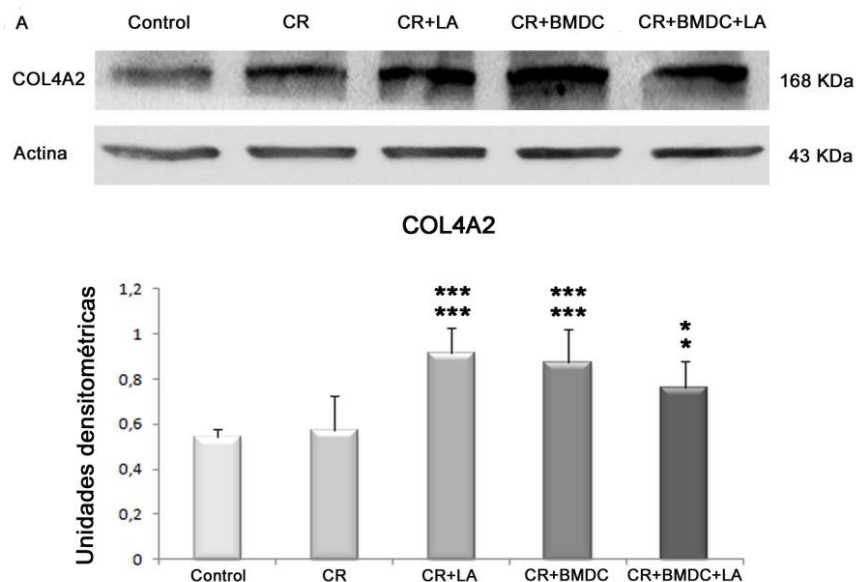


Fig.59. Presencia de COL4A2 tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 8 días tras la CR. (A) Imagen del western blot para la proteína COL4A2 en cada grupo experimental mostrando el incremento en los niveles de colágeno en todos los animales tratados. (Gráfico) El gráfico muestra la cuantificación de la densidad de las bandas (expresado como el ratio de COL4A2/Actina) en cada uno de los grupos experimentales. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$.

La cuantificación muestra que la administración de LA o el tratamiento con BMDC (CR+LA y CR+BMDC) incrementa de manera significativa ($p < 0,001$) los niveles de colágeno comparado con los animales del grupo control y criolesionado (CR). Los niveles de colágeno incrementan también ($p < 0,05$) en el tratamiento combinado (CR+BMDC+LA) comparado con los grupos control y criolesionado (CR) (Figura 59 Gráfico).

Con el fin de estudiar las características de estos vasos sanguíneos 16 días tras la CR como principal factor en la restauración de la BHE, se empleó una inmunohistoquímica de la proteína GFAP seguida de la cuantificación del número y diámetro de los vasos sanguíneos. Los datos se expresaron como el número total de vasos sanguíneos referido al total del área cuantificada y como promedio del diámetro de todos los vasos sanguíneos dentro de las primeras 100 micras, respectivamente. Por una parte, se observa una disminución significativa del número de vasos sanguíneos en el grupo criolesionado (CR) ($p < 0,001$) cuando comparamos con los animales controles. Además, se muestra un incremento significativo en este número de vasos sanguíneos ($p < 0,05$ y $p < 0,01$) en los grupos tratados de manera individual con LA o BMDC (CR+LA y CR+BMDC, respectivamente) el cual es incluso mayor ($p < 0,001$) en el grupo tratado con la terapia combinada (CR+BMDC+LA) cuando comparamos con los animales criolesionados (CR). Por otra parte, el diámetro de los vasos sanguíneos es significativamente mayor en los tres grupos tratados comparado con los no tratados. Por lo tanto, se observa un incremento significativo ($p < 0,01$) del grupo tratado con LA (CR+LA) comparado con el grupo control. De la misma forma, se observa un incremento significativo ($p < 0,001$) en el grupo tratado con BMDC y el grupo tratado con ambas terapias comparado con el grupo control. Además, los resultados muestran un incremento significativo del diámetro de los vasos sanguíneos ($p < 0,05$ y $p < 0,01$) en los grupos tratados de manera individual con LA o BMDC (CR+LA y CR+BMDC, respectivamente) los cuales son incluso mayores ($p < 0,001$) en el grupo tratado con terapia combinada (CR+BMDC+LA) cuando comparamos con los animales criolesionados (CR). Por último, estas medidas fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en el grupo CR+BMDC+LA cuando comparamos con el grupo CR+LA (Figura 52 Gráficos).

4.9. Análisis de la presencia de neuronas tras el tratamiento celular y farmacológico

Al igual que en el estudio realizado para el tratamiento de LA a corto y largo plazo, aquí evaluamos la posible presencia de axones neuronales de nueva formación en el área dañada y para ello realizamos una inmunohistoquímica para el marcador molecular específico MAP2 junto con el marcador específico BrdU 8 días tras la CR. Se observa un incremento del marcador de neuronas maduras extendiendo sus terminaciones nerviosas hacia la zona dañada en los grupos tratados (Figura 60 B - D) cuando comparamos con el grupo criolesionado no tratado (Figura 60 A).

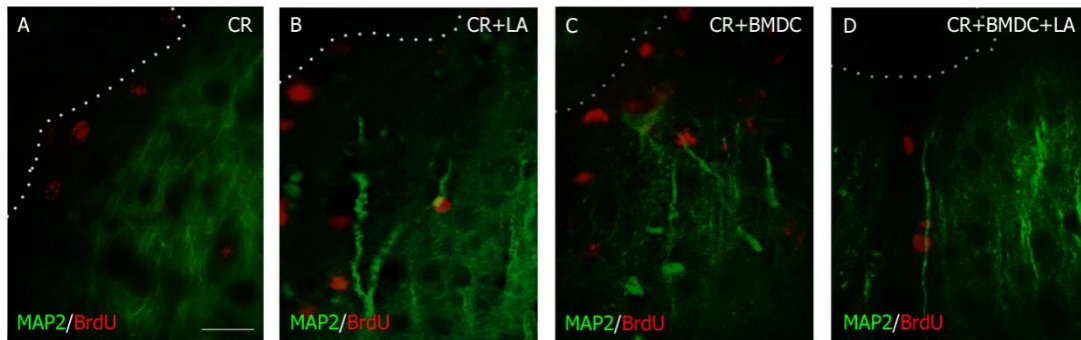


Fig.60. *Inmunofluorescencia doble para MAP2 (verde) y BrdU (rojo) en cada uno de los grupos de estudio 8 días tras la CR. (B-D) Se observa la presencia de axones neuronales en el área dañada de animales tratados. Escala: 50 μ m.*

DISCUSIÓN

1. Efecto del tratamiento con ácido lipoico sobre la viabilidad celular ante el estrés por daño oxidativo

El traumatismo craneoencefálico (TCE) como problema de salud, con alta morbilidad y mortalidad, genera al mismo tiempo grandes costes económicos. En el TCE se dan tanto daños primarios como secundarios, destacando el estrés oxidativo (Sullivan et al., 1998, Shao et al., 2006).

Diferentes estudios han demostrado que el estrés oxidativo contribuye a la muerte neuronal en diferentes patologías, entre ellas la isquemia cerebral y enfermedades neurodegenerativas (Bossy-Wetzler et al., 2004, Mehta et al., 2007), pues el cerebro es altamente susceptible al daño oxidativo comparado con otros tejidos (Halliwell, 2006).

La defensa celular, con el sistema glutatión (GSH) y las enzimas antioxidantes, protegen al tejido del efecto dañino de los radicales libres, siendo el GSH el mayor antioxidante intracelular (Ross, 1998). No obstante, la capacidad del sistema antioxidante endógeno del cerebro es limitada y por ello, el uso de antioxidantes como el ácido lipoico (LA; lipoic acid) podrían proteger el tejido neural del daño ocasionado al aumentar las especies reactivas de oxígeno (ERO).

Es conocido el efecto del LA por su papel como coenzima en el metabolismo energético. Además, cuando es suplementado en la dieta se absorbe y localiza en todos los compartimentos celulares donde actúa como modulador del estado redox celular. El LA es transportado a diferentes órganos como el cerebro porque tiene la potestad de atravesar libremente la barrera hematoencefálica (BHE) (Roy et al., 1997, Roy and Packer, 1998, Cakatay, 2006, Schreibelt et al., 2006, Shay et al., 2009). El LA o su forma reducida, el dihidrolipoico (DHLA; dihydrolipoic acid) tiene muchas funciones bioquímicas actuando como antioxidante biológico, como quelante de metales (Ou et al., 1995, Bast and Haenen, 2003, Smith et al., 2004), atrapando las ERO, reduciendo la forma oxidada de otros agentes antioxidantes como las vitaminas C y E y el GSH, reduciendo la peroxidación lipídica y modulando la transducción de señales de varias vías, como la insulina y el factor nuclear kappa B (NFκB; nuclear factor kappa B) (Packer et al., 1995a, Akpınar et al., 2007, Applegate et al., 2008, Golbidi et al., 2011, Packer and Cadenas, 2011).

Se ha descrito cómo el ambiente redox extracelular tiol/disulfido, determinado por la pareja cisteína/cistina, modula la proliferación celular, la apoptosis, la liberación de moléculas de adhesión celular y señales proinflamatorias (Go and Jones, 2010). El LA puede modular el estado redox extracelular ya que el DHLA está involucrado en la reducción de cistina a cisteína, facilitando por lo tanto la rápida entrada de este último en la célula mediante el sistema de transporte de aminoácidos y por consiguiente, aumentando la capacidad de estimular la síntesis de GSH (Han et al., 1995, Han et al., 1997, Packer et al., 2001). Es decir, que el LA puede no solo participar en la reducción de GSSG a GSH, sino que también incrementar la síntesis de *nov*o del GSH celular de manera indirecta mejorando la utilización de la cisteína (Han et al., 1997, Packer et al., 2001). Aspecto muy importante, ya que la cisteína es muy inestable extracelularmente y se auto-oxida rápidamente a cistina, en un proceso que produce radicales libres (Meister, 1988)

Por todo esto, nos planteamos como primer objetivo el análisis del efecto del LA tras el uso de diferentes estresores tanto *in vitro* como *ex vivo*, estresores que simulan el daño oxidativo que forma parte del daño secundario a un TCE, intentando elucidar el mecanismo de acción de este antioxidante en situaciones de trauma cerebral.

Por una parte utilizamos como estresores una combinación de lipopolisacárido (LPS) y dopamina, siendo el LPS un potente inductor de inflamación y activador de macrófagos, produciendo abundantes ERO en células de microglía del cerebro (Halliwell, 2006). Los efectos neurotóxicos del LPS en las neuronas del cerebro están mediados por la activación de las células microgliales, IL-1 β y caspasa-11 (Arai et al., 2004). A este LPS se le añadió la dopamina para su administración simultánea a los cultivos, pues se ha estudiado que el aumento de ERO y especies reactivas de nitrógeno que inducen un estado de estrés oxidativo, provoca un incremento en la oxidación de la dopamina, autooxidación de catecolaminas en el sistema nervioso central (SNC), formación de radicales superóxido, producción de quinonas de dopamina, liberación y oxidación de metales de transición (Fe, Cu), peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, así como también provoca un daño proteico (Graham, 1978). Las quinonas de dopamina pueden reaccionar con la cisteína y producir residuos de cistenil, estos residuos son capaces de inhibir la función de muchas proteínas, y producir disminución de ATP por el bloqueo de la cadena respiratoria (Ramsden et al., 2001).

En el presente trabajo, se ha observado cómo tras la aplicación de estos estresores en un cultivo celular de corteza cerebral se produce una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular y un aumento de la muerte celular, que sin embargo tiende a disminuir tras la aplicación del antioxidante LA. Estos resultados coinciden con los encontrados en otros estudios como el de Tomassoni y colaboradores, en el que el uso de LA fue capaz de inhibir la reducción de la viabilidad ocasionada por estresores como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en células cancerígenas (Tomassoni et al., 2013). De manera similar ocurre en el estudio de Lee y colaboradores, en el que estimularon un sistema de co-cultivo, formado por células neuronales y microgliales, con dopamina y A β (25-35)/IFN γ , que actúa de forma similar al LPS, aumentando la muerte neuronal. Sin embargo, esta muerte se vio reducida de forma significativa al tratar el sistema con curcumina (Lee et al., 2007), un antioxidante natural con propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas (Sharma et al., 2005). De igual forma, en otros estudios se determinó que el LA tenía efectos antiapoptóticos además de los citados efectos antioxidantes (Bae et al., 2009, Dadhania et al., 2010).

Además, en el presente trabajo se observó que en los grupos tratados *in vitro* con los estresores (LPS+DOP) y en los grupos tratados con los estresores y posteriormente tratados con LA (LPS+DOP+LA) se producía un aumento estadísticamente significativo de los niveles de GSH respecto al grupo control, sin embargo, los niveles de glutatión disulfuro (GSSG) se mostraban aumentados de manera significativa en el grupo estimulado únicamente con los estresores (LPS+DOP), aunque estos niveles tendían a disminuir tras el tratamiento con LA. Por lo tanto, se observó una tendencia a la disminución del ratio GSH/GSSG en el grupo estimulado con los estresores (LPS+DOP), respecto al grupo control, mientras que el tratamiento posterior con LA (LPS+DOP+LA) tendía a aumentar el ratio, aproximándose a los valores obtenidos en el grupo control. Por lo que hipotetizamos que quizá debido al gran estrés

producido en las células por el daño oxidativo, éstas tiendan a incrementar la producción de GSH como mecanismo de defensa para contrarrestar los bajos niveles de GSH intracelular, pero, el GSSG continua siendo elevado y por tanto el ratio aparece disminuido. Sin embargo, al tratar las células con LA, los niveles de GSH aumentan y además los niveles de GSSG tienden a disminuir, mostrándose un ratio GSH/GSSG más elevado, lo que podría significar que el LA está actuando mediante la estimulación de la conversión de GSSG a GSH y no mediante la síntesis de *novo* de GSH, puesto que los niveles de glutamato, que es uno de los precursores del GSH junto con la cisteína y la glicina, no varían entre los grupos. Esto confirmaría los estudios que afirman como el LA es capaz de regenerar el GSH (Akpinar et al., 2007, Applegate et al., 2008).

Por otra parte, aplicamos al cultivo celular de la corteza cerebral el estresor L-Butionina-S,R-sulfoximina (BSO), que es un inhibidor de la síntesis de GSH ya que inhibe la enzima limitante para dicha síntesis, la γ -glutamyl-cisteína sintetasa (γ -GCS) (Griffith, 1982). Esta enzima es de gran importancia ya que la síntesis de GSH involucra dos pasos. En el primero, se produce la formación de la γ -glutamylcisteína (γ GC) por dos sustratos, el L-glutamato y la L-cisteína mediante la γ -GCS (Huang et al., 1988). En el segundo paso, la γ GC y el ATP se combinan para formar L- γ -glutamyl-L-cistenilfosfato que se combina con la glicina en una reacción catalizada por la GSH sintetasa para formar GSH. Bajo condiciones normales, el ratio de síntesis de GSH está determinado por dos factores, la disponibilidad de la cisteína y la actividad de la γ -GCS (Trotta et al., 1974, Griffith and Mulcahy, 1999).

En el presente trabajo se muestra que el tratamiento de las células con BSO disminuye la viabilidad y aumenta la muerte celular de forma significativa, sin embargo, el posterior tratamiento con LA mejora esta viabilidad y disminuye la muerte celular de forma significativa. Esto se asemeja a lo encontrado en otros estudios como el de Yamada y colaboradores, en el que el co-tratamiento con LA mejoró de manera significativa la viabilidad contra la toxicidad inducida por el BSO en células cancerígenas (Yamada et al., 2011). Además, en nuestro trabajo no se encontraron diferencias entre el grupo tratado con el BSO y el grupo tratado con BSO+LA, en cuanto a los niveles de GSH, GSSG y el ratio de ambos. Esto ocurre de manera similar en el estudio de Yamada y colaboradores, en el que no encontraron diferencias en cuanto a los niveles de GSH de los grupos tratados con BSO y los grupos tratados con BSO y LA. En este estudio concluyeron que el LA prevenía la muerte celular inducida por fármacos que disminuían el GSH a través de diferentes mecanismos, incluyendo vías como PI3K/Akt (Yamada et al., 2011) confirmado también por otros estudios (Zhang et al., 2007b). Además, estudios llevados a cabo por Han y colaboradores, mostraron que los niveles de GSH de células de linfocitos T humanos Jurkat, que se utilizan para estudiar la leucemia aguda de células, se vieron disminuidos por el inhibidor de la γ -GCS, el BSO, siendo esta disminución no prevenida por el LA. De manera similar, el estudio realizado por Miranda y colaboradores, mostraron que la administración de BSO a ratones rd1, modelo de ratones ideal para el análisis experimental de las distrofias de la retina, agotaba el GSH de la retina y además, la administración de un mix de antioxidantes, entre el que se encontraba el LA, no pudo incrementar los niveles de GSH (Miranda et al., 2010).

Esto sugiere que el mantenimiento del estado del GSH depende de la continua síntesis de *novo*. Además, el fallo del LA en prevenir la pérdida de GSH ocasionada por el BSO muestra que el efecto del LA en los niveles de GSH requiere del funcionamiento de la γ -GCS (Han et al., 1997).

Con el fin de elucidar el mecanismo del LA en el cerebro realizamos también el análisis de los niveles de GSH, GSSG y malondialdehído (MDA) en un modelo *ex vivo*, provocando un daño oxidativo en un homogenado de cerebro mediante el uso de Fe (II) y ácido ascórbico que luego tratamos con diferentes concentraciones de LA.

En este estudio observamos que el posible efecto beneficioso y la disminución del estrés oxidativo podría deberse a que el LA aumenta las concentraciones de GSH. Además, este aumento de GSH se produce porque parece que el LA está estimulando la conversión de GSSG a GSH y no porque se sintetice GSH de *novo*. Esto lo observamos debido al aumento significativo de los niveles de GSH en los grupos tratados con LA a 4 y 10 μ M, la disminución significativa de las concentraciones de GSSG de las muestras tratadas con LA a partir de la administración de LA 1 μ M y el aumento del ratio de GSH/GSSG de las muestras tratadas con LA a 4 y 10 μ M. Como hemos mencionado, esto es de gran importancia porque indica que la mayor parte del par GSH/GSSG se encuentra en su forma reducida. Además, se observa que este efecto es dosis dependiente y claramente observable en los grupos tratados a las mayores concentraciones de LA, 4 y 10 μ M. Por el contrario, no se encontraron diferencias entre los valores de glutamato obtenido en los diferentes grupos de estudio, corroborando que está actuando por esta vía y no mediante la síntesis de *novo* de GSH.

Estos resultados están de acuerdo con aquellos que muestran como el LA/DHLA pueden regenerar otros antioxidantes como la vitamina C, E y el ratio de GSH/GSSG (Packer et al., 1995b, Szelag et al., 2012, Dalazen et al., 2014). Pero además se ha determinado cómo el LA y su metabolito el DHLA puede proteger contra la peroxidación lipídica, es decir la modificación oxidativa de los lípidos, mediante la quelación de iones metálicos divalentes, como el hierro y el cobre (Skibska et al., 2006). Por ello se obtuvieron en todos los grupos de estudio los niveles de MDA, uno de los productos finales de la peroxidación de los lípidos de membrana, observando una bajada de los mismos al aumentar la concentración de LA, siendo especialmente marcada en los niveles de LA 10 μ M. Esto es importante ya que se considera que la peroxidación lipídica está mediada por radicales libres actuando sobre los ácidos grasos insaturados componentes de los lípidos de las membranas y causa importante de la destrucción de la membrana y muerte celular (Janero, 1990, Riedel et al., 2003, Derin et al., 2004).

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios. Se ha demostrado como debido a un TCE se produce un incremento de la peroxidación lipídica y una disminución de GSH, indicando daño oxidativo (Kerman et al., 2005, Ozdemir et al., 2005, McAllister, 2011, Bains and Hall, 2012). De manera similar a nuestro estudio, otros investigadores han mostrado como el LA es capaz de aumentar los niveles de GSH que habían disminuido debido a un trauma (Toklu et al., 2009). Así mismo, estudios más recientes han demostrado que tras la administración de LA oral en un modelo de TCE se produce un

incremento en el número de neuronas y una disminución del estrés oxidativo y la apoptosis (Ozbal et al., 2015).

2. Terapia farmacológica con ácido lipoico tras daño focal en sistema nervioso central. Efectos celulares y tisulares tras el tratamiento

2.1. Idoneidad del modelo de criolesión y respuesta al tratamiento farmacológico con ácido lipoico

En términos generales, los dos tipos de daño focal agudo en el SNC son el daño traumático y el accidente cerebrovascular isquémico. Ambos han sido utilizados durante décadas como el modelo tipo en experimentación para el estudio de los mecanismos responsables del daño y reparación en el SNC.

El modelo experimental de lesión cerebral utilizado en este trabajo (modelo de criolesión tanto en rata como en ratón) ha empezado a ser muy ventajoso en comparación con otros modelos establecidos de daño cerebral traumático (por ejemplo percusión lateral por fluido, los modelos de caída de peso) (Klatzo et al., 1958, Feeney et al., 1981, McIntosh et al., 1989, Cernak, 2005), porque esta lesión está claramente circunscrita, es cuantificable fácilmente y altamente reproducible en tamaño y localización (Siren et al., 2006, Cederberg and Siesjo, 2010, Sauerbeck et al., 2011, Raslan et al., 2012, Rocamonde et al., 2012).

La respuesta llevada a cabo por el SNC tras un daño focal agudo se puede dividir en términos generales en tres fases que pueden coincidir en el tiempo, una primera fase de muerte celular e inflamación, una segunda fase de proliferación celular para el reemplazo del tejido y una última fase de restauración del tejido (Burda and Sofroniew, 2014).

Se ha establecido un interés creciente por identificar el mejor modo de manipular y mejorar esta respuesta al daño en el SNC. Incluyendo, no solo enfoques más tradicionales como el desarrollo de fármacos de administración parenteral, sino también mediante modificaciones del estilo de vida como por ejemplo la implementación con estrategias de ejercicio o la suplementación dietética con antioxidantes (Arumugam et al., 2010, Mattson, 2012, Sun et al., 2012, Piao et al., 2013, Iwata et al., 2014). Además, se están desarrollando nuevas estrategias como el implante de biomateriales (Yang et al., 2009, Pakulska et al., 2012, Song et al., 2012, Zhang et al., 2014, Martinez-Ramos et al., 2015) pudiendo contener un depósito de moléculas para su liberación local, así como estrategias regenerativas basadas en el trasplante de células madre o progenitoras. Respecto a estas últimas, son varias las terapias celulares que pueden ser efectivas para la reparación del SNC (Martino and Pluchino, 2006, Bliss et al., 2007, Snyder and Teng, 2012). De entre estas, las células estromales o mesenquimales derivadas de la médula ósea o del cordón umbilical y liberadas en el SNC pueden proporcionar factores de crecimiento, citoquinas y otros factores que pueden influenciar la respuesta a un daño del SNC y los consiguientes procesos de reparación (Bliss et al., 2007, Kokaia et al., 2012, Lemmens and Steinberg, 2013).

Sin embargo, la información publicada sobre la eficacia funcional de todas estas terapias es todavía limitada. Por ello, estudiar la respuesta multicelular y de gliosis reactiva tras

un daño en el SNC, así como los cambios a lo largo del tiempo y sus mecanismos moleculares es esencial para comprender ampliamente los desordenes ocasionados en el SNC y por tanto poder desarrollar una estrategia terapéutica eficaz que permita llevar a cabo una mejora de esta respuesta tras el daño del tejido.

Por eso, en este trabajo se ha propuesto como segundo objetivo comparar la respuesta al daño cerebral por criolesión a corto y largo plazo con o sin tratamiento con el antioxidante LA.

Se ha descrito que tras una lesión madura, considerada así, tras dos o cuatro semanas de evolución del daño, se presentan tres compartimentos (Burda and Sofroniew, 2014). Un núcleo de lesión, seguido de una cicatriz glial (GS; glial scar) que rodea el núcleo de la lesión, formada principalmente por astrocitos de nueva proliferación (Wanner et al., 2013) y por último, una zona adyacente a la GS formada fundamentalmente por células del linaje neural incluyendo neuronas y oligodendrocitos. Tanto las neuronas viables que sobreviven al daño como otros elementos del tejido neural están entretejidas con los astrocitos reactivos y la microglía reactiva (Burda and Sofroniew, 2014).

En concordancia con estos estudios, uno de los primeros resultados que obtuvimos en nuestro grupo de investigación respecto al tratamiento con LA tras una lesión cerebral *in vivo*, fue la descripción de tres zonas alrededor del área lesionada 15 días tras la criolesión. Tal como se ha descrito previamente, se encontró una GS bien establecida alrededor de la cavidad cística (CC) situada próxima al ventrículo lateral (LV; lateral ventricle). A esta GS le siguió una zona dañada denominada DZ (damaged zone). Finalmente, se observó una zona no afectada llamada IZ (intact zone), como parte del parénquima neural (Figura 36). (Rocamonde et al., 2012) Sin embargo, el tratamiento de LA durante 7 días tras la criolesión provocó una disminución de la GS y una continuidad del tejido neural expandido hacia la CC a los 60 días tras la criolesión, tal y como se había determinado en estudios anteriores a los 15 días, pudiendo todo esto ser interpretado como un proceso de renovación tras muerte celular y posterior proliferación (Rocamonde et al., 2013).

2.2. Respuesta astrogliar ante un tratamiento farmacológico con ácido lipoico

Se conoce además cómo tras una lesión cerebral, moléculas inflamatorias procedentes de las células dañadas y muertas son liberadas al medio extracelular provocando la activación de la microglía y astrogliar (Klatzo et al., 1958, Rocamonde et al., 2012). En el SNC normal, los astrocitos llevan a cabo variedad de funciones entre las que se incluye el mantenimiento de la BHE, la homeostasis iónica, la regulación de los neurotransmisores y la formación de sinapsis, es decir, que los astrocitos son parte importante en el mantenimiento de la estructura, el metabolismo y la función del cerebro (Barcia et al., 2008, Zhang and Barres, 2010), pero además, los astrocitos se activan y responden ante cualquier daño del SNC a través de un proceso referido como astrogliosis reactiva (Laki et al., 1958, Bushong et al., 2004, Wilhelmsson et al., 2006, Chvatal et al., 2007). Los astrocitos reactivos se caracterizan morfológicamente por un aumento de tamaño (hipertrofia) y un incremento en el número y extensión de sus prolongaciones (Buffo et al., 2010). Además, tal y como hemos comentado

anteriormente expresan altos niveles de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP; glial fibrillary acidic protein); que corresponde a un tipo de filamento intermedio específico de los astrocitos que se ha establecido como uno de los marcadores más sensibles para observar la reacción astrocítica (Hatten et al., 1991); así como también expresando un aumento de vimentina, tenascina C y nestina. Además, en casos de daño severo, pueden dar lugar a un aumento de la proliferación y a la formación de la cicatriz glial (Wanner et al., 2013).

En relación con estos conceptos, estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo mostraron que el LA disminuye la reactividad astrogliar, pues aunque no se observó una disminución en el número de astrocitos, se mostró una reducción del área ocupada por estas células gliales y también se observó como el LA evita la formación de la cicatriz glial 15 días tras la criolesión (Rocamonde et al., 2012). Adicionalmente, en el presente trabajo se han comparado estos datos obtenidos a corto plazo con los obtenidos a largo plazo, mostrando que la cicatriz glial permanece incluso 60 días tras la criolesión en aquellos animales no tratados, mientras que el tratamiento con LA evita por completo la formación de la cicatriz a largo plazo y las células astrogliales se distribuyen al azar por el tejido adyacente (Figura 38) (Rocamonde et al., 2013).

Estos resultados que demuestran cómo la cicatriz glial persiste 60 días tras una criolesión, están de acuerdo con los estudios obtenidos por Villapol y colaboradores, que muestran una fuerte astrogliosis desde los 7 días tras la lesión y hasta los dos meses posteriores, siendo los astrocitos los que contribuyen a la formación de la cicatriz glial (Villapol et al., 2014). En otros estudios en los que se ha realizado una lesión de la médula espinal, se ha visto como en los primeros estadios de la lesión, los astrocitos proporcionan soporte al área dañada manteniendo la barrera hematoespinal, secretando citoquinas y previniendo la excitotoxicidad. Sin embargo, en un estado secundario de lesión, los astrocitos se vuelven reactivos formando la cicatriz glial y produciendo proteoglicanos inhibitorios que impiden la regeneración axonal (Fitch and Silver, 2008).

En resumen, la astrogliosis puede tener efectos tanto beneficiosos como perjudiciales sobre la recuperación del tejido. Pues, se ha demostrado que estos astrocitos hipertróficos y la formación de la cicatriz glial tiene efectos inhibitorios para la regeneración axonal y celular, sin embargo, por otra parte, hay algunas evidencias que adjudican un papel positivo para los astrocitos tras una lesión cerebral, ya que tienen capacidad fagocítica y son parcialmente responsables de la eliminación de desechos, minimizando así la extensión del daño y la inflamación en los estados agudos tras el trauma cerebral (Schwab et al., 2001, Faulkner et al., 2004). Recientes estudios han demostrado también que la preservación de la función astrocítica puede ser importante para prevenir la muerte neuronal programada en el cerebro dañado (Min et al., 2012, Jeong et al., 2014). Por el contrario, se ha observado que en estadios más tardíos estos astrocitos facilitan la formación de la cicatriz glial post-traumática (Fawcett and Asher, 1999, Pekny et al., 2007) involucrada en la inhibición de neuritas y por tanto en la reparación tras el daño en el SNC (Muellner et al., 2003, Zhang et al., 2006, Busch and Silver, 2007). Según estos estudios, la reducción de la cicatriz glial que nosotros observamos 15 días y 60 días tras la criolesión con el tratamiento antioxidante, podría favorecer la reparación del tejido.

2.3. Respuesta microglial ante un tratamiento farmacológico con ácido lipoico

Tras analizar la respuesta astrogliar, estudiamos si esta reducción de la cicatriz glial tras el tratamiento con LA permite la llegada de células microgliales que están involucradas en procesos de remodelación. Pues se ha descrito que ambos, astrocitos y microglía juegan un papel fundamental en la sinapsis mediante la remodelación del área lesionada y potencialmente recuperable (Stevens et al., 2007, Stephan et al., 2012).

La microglía se considera parte de la respuesta inmune del SNC (McIntosh et al., 1989). Pues la actividad de ingerir células apoptóticas ha sido atribuida tradicionalmente a fagocitos profesionales como macrófagos, microglía y células dendríticas (Cernak, 2005). Además, avances recientes en la biología molecular han revelado que la microglía puede tener funciones homeostáticas importantes (Cederberg and Siesjo, 2010) y son muy activas en la vigilancia del medio ambiente neuronal en el cerebro normal, siendo las primeras células en responder a algún cambio sutil producido en éste (Raslan et al., 2012). Bajo condiciones patológicas, la microglía se transforma rápidamente en microglía reactiva con morfología ameboide y es expandida para responder al daño o estímulo (Sauerbeck et al., 2011) y afectar notablemente a las interacciones neuronales y las funciones del SNC, con la liberación de diversas sustancias citotóxicas entre las que se incluyen factores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF α ; tumor necrosis factor alpha), interferón gamma (IFN γ) y factores de estrés oxidativo que son tóxicos para las neuronas (Chatzipanteli et al., 2002, Block and Hong, 2005, Burda and Sofroniew, 2014). En estos último años se ha descrito también una nueva morfología microglial "rod microglía" y se ha hipotetizado como esta microglía con morfología alargada es capaz de aislar a las neuronas no dañadas de un ambiente adverso (Taylor et al., 2014).

En este trabajo, se ha identificado la morfología de la microglía en los dos grupos de estudio, para poder discriminar la microglía ramificada (en reposo), de la microglía ameboide (fagocítica). Se ha visto como la microglía se incrementó a los 15 días y disminuyó a los 60 días tras la criolesión en aquellos grupos criolesionados tanto tratados como no tratados con el LA, llegando a valores controles. Sin embargo, solo el grupo no tratado mostró microglía ramificada a los 15 días tras la criolesión (Figuras 40 y 41). Además, las células fagocíticas se incrementaron significativamente en el grupo tratado con LA a los 15 días, mientras que el grupo no tratado mostró su mayor incremento a los 60 días, observado tanto por la morfología de las células microgliales mediante la inmunohistoquímica para el marcador Iba1, como por el marcaje de células fagocíticas con el anticuerpo ED1 (Figuras 40 y 42). En vista de estos resultados, hipotetizamos que la administración de LA tras el daño cerebral evita la formación de la cicatriz glial, pudiendo promover la restauración del tejido a través de la respuesta inmune temprana desarrollada por la microglía (Rocamonde et al., 2013).

Sin embargo, actualmente hay una pregunta abierta sobre el papel de las células microgliales. En general, se cree que al igual que los astrocitos, la microglía juega tanto un papel perjudicial como beneficioso en el daño cerebral, dependiendo del tiempo y la severidad de la inflamación. Pues, aunque durante las primeras horas y días, la microglía puede facilitar

la muerte y destrucción de las células nerviosas por la liberación de agentes como el TNF α , el óxido nítrico (NO; nitric oxide), el H₂O₂ y aniones superóxido; más tardíamente, la microglía puede fomentar la supervivencia de las células y la reparación de los tejidos por la síntesis de factores de crecimiento que estimulan la astrogliosis y la supervivencia neuronal (Arango-Davila et al., 2004). Por lo tanto, se cree que la activación microglial en un corto periodo de tiempo no es perjudicial pudiendo incluso tener efectos beneficiosos por producir sustancias neuroprotectoras en respuesta a un daño, incluyendo citoquinas antiinflamatorias y factores neurotróficos. Además, hay diversos estudios proponiendo que bajo ciertas circunstancias, la microglía podría ser neuroprotectora (Hofmann et al., 1995, Ziegler et al., 1995, Siren et al., 2006) y promover la neurogénesis adulta a través de la liberación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; brain-derived neurotrophic factor) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1; insulin-like growth factor 1) (Cao and Phillis, 1995, Slepneva et al., 1995). También se ha visto en estudios realizados sobre la isquemia cerebral, que la respuesta inmune innata puede ser beneficiosa (Jacob et al., 1995, Schonheit et al., 1995). De hecho, se ha mostrado que la microglía tiene un papel de soporte neuronal por la captación de glutamato (Sandhya et al., 1995) y la eliminación de desechos celulares (Maitra et al., 1995). Sin embargo, el TCE es de mayor complejidad por su variada respuesta celular que no solo incluye astrocitos y microglía, sino también células endoteliales, leucocitos, neuronas y otros que interactúan en la respuesta al daño (Kang et al., 2014).

2.4. Respuesta angiogénica ante un tratamiento farmacológico con ácido lipoico

Se ha descrito que dentro de los procesos que se producen en el daño secundario tras la lesión, se incluye la alteración de la unidad cerebrovascular (Martin-Lopez et al., 2013), con una disminución en el flujo sanguíneo cerebral y por tanto en el consumo de oxígeno y glucosa (Iadecola and Nedergaard, 2007). Sin embargo, no hay estudios que analicen con profundidad el patrón temporal de esta disrupción.

Se sabe que la integridad funcional y estructural del cerebro depende de un continuo aporte vascular de oxígeno y glucosa, y si el flujo sanguíneo cerebral es interrumpido o incapaz de incrementar la demanda metabólica, cesa la función neuronal conllevandola a una muerte retardada (Ragaisis, 2002, Longhi et al., 2003, Alessandri et al., 2012). Es también sabido que los antioxidantes como el LA, ayudan a reducir la permeabilidad de la BHE y por lo tanto el daño celular, manteniendo el balance iónico de Ca²⁺ y Mg²⁺ en las células endoteliales del cerebro. En el estudio realizado previamente a los 15 días de la criolesión, se observó como el LA era capaz de estimular la angiogénesis tras el daño cerebral. Además era capaz de estimularla por él mismo, puesto que esta angiogénesis estaba estimulada incluso tras bloquear, mediante la administración de bevacizumab, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; vascular endothelial growth factor) que es en parte responsable de la síntesis de colágeno. Además, se observó que la distribución de los vasos sanguíneos en los animales tratados con LA era paralela en dirección a la CC formada tras la lesión (Rocamonde et al., 2012). En el presente trabajo, se compararon estos resultados con los obtenidos a largo plazo y se vio como a los 60 días tras la criolesión el tratamiento con LA seguía estimulando la

angiogénesis, mostrando, al igual que se presentó en el estudio realizado a corto plazo, una distribución de los vasos dirigidos hacia la CC, al tiempo que mostraban un mayor calibre. Sin embargo, en los animales no tratados los vasos sanguíneos presentaban un menor grosor y una distribución aleatoria (Figura 43).

Tras todas estas observaciones, pensamos que tras el tratamiento con LA gracias en parte a esta disminución de la cicatriz glial, se produce un aumento de células microgliales con actividad fagocítica en el área lesionada junto con una llegada de vasos sanguíneos de nueva formación y direccionados hacia la CC que podrían ayudar a evitar la muerte neuronal en este área lesionada adyacente a la CC y por tanto a su reparación. Por ello decidimos estudiar la presencia de neuronas en este área lesionada con y sin el tratamiento del LA tanto a corto como a largo plazo. Además otros investigadores como Kojima y colaboradores, han mostrado cómo las células progenitoras neurales derivadas de zonas neurogénicas como la zona subventricular (SVZ; subventricular zone), migran a través de los vasos sanguíneos desde la SVZ hacia la región dañada, sugiriendo que los vasos sanguíneos juegan un papel muy importante como andamio para la migración y llegada de estas células a las regiones cerebrales dañadas (Kojima et al., 2010).

2.5. Respuesta neuronal ante un tratamiento farmacológico con ácido lipoico

Los cambios adaptativos en la estructura y la función de las neuronas que ocurren permanentemente en el cerebro adulto y que corresponden a la denominada plasticidad cerebral, están implicados en procesos como el aprendizaje y la memoria y además, desempeñan un importante papel en la recuperación del sistema nervioso ante diferentes tipos de lesión (Kolb and Whishaw, 1998, Tokuda and Hatase, 1998). Para poder observar el estado neuronal, se realizaron técnicas de inmunofluorescencia mediante anticuerpos específicos para la proteína asociada a los microtúbulos (MAP2), pues debe recordarse, que el citoesqueleto de la neurona es uno de los principales elementos relacionados con su morfología y su plasticidad. Este citoesqueleto está constituido por microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos, siendo esta proteína MAP2 responsable en gran parte de la polimerización, estabilidad y organización de las unidades de tubulina α y β que constituyen los microtúbulos (Wiche et al., 1991, Mandelkow et al., 1995) y por ende, se requiere para preservar la morfología y la conectividad neuronal. Tiene relación con importantes cascadas bioquímicas de reacción intracelular y extracelular, lo que la hace particularmente sensible a las alteraciones ocasionadas por la lesión cerebral. Se establece pues como un sensible marcador de sufrimiento neuronal y representa un modelo de reorganización estructural y sináptica.

Por lo tanto, tras analizar nuestros resultados de inmunofluorescencia realizada de MAP2 tanto a corto como a largo plazo, pudimos concluir que el LA es capaz de evitar parte del sufrimiento neuronal ocasionado por la lesión, puesto que podemos encontrar axones neuronales en el área adyacente a la CC, que sin embargo no encontramos en aquellos animales no tratados con el antioxidante (Figura 44).

Estos resultados, avalados por los también resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, confirman el tratamiento con LA como una nueva estrategia reparativa tras el daño cerebral y quizá otras enfermedades neurodegenerativas. Además, por primera vez presentamos los efectos de neurorestauración del LA a largo plazo tras una criolesión. Estos resultados son comparables con los obtenidos recientemente por Choi y colaboradores, que muestran cómo el tratamiento inmediato de LA tras un accidente cerebrovascular tiene efectos de neurorestauración a largo plazo contra el daño neural ocasionado en ratas jóvenes. Además, presentan que esto es debido, al menos en parte, a la mejora de la neuroproliferación (Choi et al., 2015).

Por tanto, varios estudios confirman el efecto beneficioso del LA en el tratamiento de muchas enfermedades como diabetes, aterosclerosis, proceso degenerativo en neuronas, enfermedades de las articulaciones o el síndrome de la deficiencia inmune adquirida, así como enfermedades oculares (Packer et al., 1995a, Sanz et al., 2007, Merida et al., 2013, Zhao and Hu, 2014). Además, otros estudios entre los que se encuentran los realizados por nuestro grupo de investigación y que incluyen parte de los resultados mostrados en este trabajo, demuestran que en modelos animales de daño cerebral traumático y accidente cerebrovascular, el LA es capaz de restaurar la disrupción de la BHE, estimular procesos angiogénicos y normalizar la activación astrocítica/microglial (Gonzalez-Perez et al., 2002, Schreibelt et al., 2006, Toklu et al., 2009, Rocamonde et al., 2012, Rocamonde et al., 2013). Diferentes estudios han mostrado también el efecto neuroprotector del LA como un antioxidante y agente antiinflamatorio (Freitas, 2009, Toklu et al., 2009), así como su capacidad para regular varios genes involucrados en la supervivencia celular, inflamación y estrés oxidativo (Larghero et al., 2007).

Los datos obtenidos de nuestro trabajo resultan sin duda prometedores en el avance de una correcta terapia con fines reparativos. No obstante, serían necesarios estudios ulteriores que profundizasen en la respuesta de la microglía frente al daño cerebral focal, atendiendo a procesos más concretos como la inflamación o la respuesta a más corto y largo plazo. Por otra parte, y a pesar de no haber encontrado un aumento significativo en el número de neuronas en la zona afectada, sí que es cierto que el aumento de dendritas y proyecciones neuronales hacia la zona dañada resultan evidentes, coincidiendo con estudios anteriores (Leon et al., 2000, Kokaia and Lindvall, 2003, Schmidt and Leach, 2003). Siguiendo estos resultados, sería de crucial interés profundizar en el estudio de la arborización neuronal y la posible conectividad entre neuronas a fin de conectar áreas dañadas.

Comprender el comportamiento de las células neurales tras un daño cerebral focal y entender mecanismos en su respuesta frente a una terapia farmacológica es algo de sumo interés en el diseño de nuevas terapias con fines reparativos.

3. Combinación de terapia celular y farmacológica con fines de reparación

3.1. Idoneidad de la terapia celular empleada con fines de reparación tras daño cerebral focal

Estudios recientes sugieren que la reparación del sistema nervioso requiere la combinación de estrategias terapéuticas para una restauración eficaz de la pérdida celular basada en la protección de la red neural ya establecida, el suministro sanguíneo y la activación de un mecanismo intrínseco de reparación (Shen et al., 2012, Kaengkan et al., 2013).

En el presente trabajo se pretenden analizar dos enfoques terapéuticos distintos, basándonos principalmente en estudios morfológicos y de inmunohistoquímica junto con aporte molecular.

Por ello, el tercer objetivo del trabajo ha sido comparar la terapia de LA con la terapia basada en el trasplante de células derivadas de la médula ósea (BMDC; bone marrow derived cells) tras criolesión, así como estudiar posibles efectos sinérgicos del tratamiento combinado. En concreto, este estudio no se ha centrado en la diferenciación de las células trasplantadas en células neurales, sino en cómo estas células son capaces de regenerar la zona lesionada. Pues tal y como han mostrado otros estudios en los que se han desarrollado otros modelos de daño cerebral, el efecto terapéutico de estos trasplantes tiene mayor importancia por su capacidad en modificar el medioambiente del tejido lesionado, disminuir el estrés oxidativo y la muerte neural por apoptosis ayudando a regenerar el área lesionada, que por su capacidad de transdiferenciación (Calio et al., 2014).

En particular, en el presente trabajo se ha demostrado que el trasplante de BMDC y el tratamiento farmacológico del LA estimula la proliferación y diferenciación de nuevas células hacia astrogliá, células endoteliales y microglía, sugiriendo su participación en la reorganización del parénquima cerebral y la angiogénesis a los 8 días tras el daño cerebral (Paradells et al., 2015).

Algunos autores han descrito la terapia celular como una estrategia fundamental para la neuroregeneración y la reconstrucción del tejido tras el daño cerebral, mediante el uso de células madre de diversas fuentes. Respecto a esto, ha sido mostrado que el trasplante de células madre mesenquimales (CMM) tras un daño cerebral o o bien de médula espinal conlleva una mejora funcional significativa. De la misma manera, ha sido descrito clínicamente cómo la administración de células mononucleares autólogas de la médula ósea (tanto intratecal como intramuscular) en combinación con un programa de rehabilitación integral, produce mejoras funcionales en daños y enfermedades neurológicas incurables en niños (Sharma et al., 2012). En un estudio realizado con 114 humanos con afectaciones degenerativas (paraplejía, ataxia y esclerosis múltiple), Yang y colaboradores realizaron un total de 592 administraciones intratecales e intravenosas de células mononucleares procedentes de la sangre del cordón umbilical sin observar graves efectos adversos. El efecto colateral más común (en el 3,2 % de los pacientes) fue dolor de cabeza atribuido a una hipotensión postural, complicación conocida tras un pinchazo lumbar, que se resolvió de manera espontánea sin la necesidad de intervenciones drásticas (Yang et al., 2010b).

Además, ha sido demostrada la eficiencia de la administración intracerebral de células multipotentes. En este sentido, ha sido mostrado que el trasplante intracerebral de CMM de la médula ósea en un modelo experimental de infarto cerebral mejora de forma significativa la recuperación funcional comparado con la administración intravenosa de estas mismas células (Kawabori et al., 2012). Por lo tanto, la estrategia celular mediante BMDC, se considera adecuada no solo por los resultados funcionales obtenidos tras daños en el SNC, sino porque pueden ser obtenidas de los propios pacientes sin dificultades éticas o inmunológicas (Azizi et al., 1998, Bliss et al., 2007, Parr et al., 2007).

En nuestro estudio se realizaron una serie de injertos intracerebrales de BMDC procedentes de donantes GFP⁺ en la corteza cerebral de ratones previamente lesionados mediante criolesión. En este modelo, las células trasplantadas desaparecieron de manera progresiva y no se detectaron tras 16 días de la lesión. Esta situación es aportada de manera similar en otros estudios, pero con tiempos superiores, pues en éstos, las células todavía se detectaron semanas e incluso meses tras el trasplante (Mahmood et al., 2006, Maruichi et al., 2009, Calio et al., 2014). Esta discrepancia podría ser debida a múltiples aspectos como el modelo animal utilizado y el tipo de células usadas, el método y la ruta de administración celular, el número total de células trasplantadas y de manera más interesante el momento en el cual se realizó el trasplante. En el presente trabajo, las células fueron inyectadas de manera intencionada en el día 1 para anticiparnos al mecanismo de daño secundario severo. Sin embargo, se ha propuesto que las condiciones inflamatorias microambientales hostiles que siguen a un daño cerebral podría explicar porqué las células trasplantadas desaparecen prontamente (Li et al., 2001a, Li et al., 2001b, Zhao et al., 2002, Shen et al., 2007a, Shen et al., 2007b, Mora-Lee et al., 2012). No obstante, se ha observado que las CMM tienen un potencial neuroprotector previniendo la muerte neural por apoptosis a través de la regulación de la expresión de genes antiapoptóticos. Por ejemplo, en el estudio realizado por Calio y colaboradores, en el que se trasplantaron CMM de forma intratecal tras un modelo de accidente cerebrovascular en ratas, el número de células apoptóticas en los animales trasplantados fue significativamente menor que en los no tratados, sugiriendo que estas células podrían prevenir la muerte neural por apoptosis a través de la regulación de la expresión de genes pro y antiapoptóticos (Calio et al., 2014). Contrariamente, en nuestro estudio se observó la activación de la caspasa 3, causante de la apoptosis, 8 días tras la criolesión, tan solo en los grupos de animales trasplantados. Sin embargo, creemos que esto podría ser debido a que las células GFP⁺ trasplantadas están muriendo en este punto, puesto que observamos un gran número de estas células a los 6 días tras la criolesión que disminuye drásticamente en los animales analizados a los 8 días y que finalmente ya no se detectan a los 16 días tras la criolesión (Figura 47).

Aunque otros estudios previos han demostrado que el tratamiento previo con factores de crecimiento de las células a inyectar incrementa el ratio de supervivencia de las BMDC tras el trasplante (Kuhn et al., 1997, Pencea et al., 2001, Li et al., 2002, Chen et al., 2003b, Zhang et al., 2004), en nuestro estudio se llevó a cabo el aislamiento de BMDC de ratones adultos, sin ninguna manipulación adicional. Se realizó una única inyección de estas células en el hemisferio derecho que fue capaz de cubrir un amplia área del cerebro adulto dañado sin

observarse grandes alteraciones morfológicas debido a la ruta de la administración. Sin embargo, en el grupo control (sin criolesión), la migración se limitó al área que rodea el sitio de inyección y/o la zona superficial. Además, las BMDC no se distribuyeron de manera homogénea a través del tejido cerebral, sino que formaron varias agregaciones celulares. De lo contrario, estas agregaciones de células GFP⁺ no se observaron en los grupos criolesionados, probablemente debido al intensivo proceso de reparación en la zona de penumbra el cual estimula la migración celular y reorganización (Touzani et al., 2001).

Sin embargo, aunque en este trabajo se han visto diferencias en la distribución de las células en los diferentes grupos de estudio, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en el número de BMDC trasplantadas entre los grupos tratados (CR+BMDC y CR+BMDC+LA) y el grupo control (Control+BMDC) a los 8 días tras la criolesión, observándose tan solo una tendencia al incremento del número de células GFP⁺ en los animales criolesionados comparado con los controles. Esto podría ser consecuencia de una sobreestimación del número total de células GFP⁺ debido a las autoagregaciones formadas (Paradells et al., 2015). Además, tal y como se ha comentado estas células tendían a disminuir con el paso del tiempo.

Aún así, se ha demostrado que el beneficio y la recuperación tisular continúan luego de que las células donantes hayan desaparecido o disminuido respecto al número de células trasplantadas inicialmente, mostrando que la permanencia limitada de las células trasplantadas tiene un efecto positivo, probablemente debido a la modificación de otros factores/células huésped (Yang et al., 2010a, Calio et al., 2014). También hay estudios en los que se ha visto que solo un pequeño número de CMM inyectadas de manera intravenosa llegan al área dañada y llevan a cabo conexiones complejas para la recuperación funcional, pero sin embargo esta pequeña proporción de células que llegan al área dañada estimulan este área y activan mecanismos endógenos de restauración y regeneración (Chopp and Li, 2002), ya que estas células secretan citoquinas y factores neurotróficos como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF; fibroblast growth factor) o el BDNF (Parr et al., 2007). De acuerdo con los estudios de Baraniak y Mc Devitt, las células madre o progenitoras no solo son capaces de inducir factores de crecimiento, sino también factores angiogénicos, antifibróticos, antiinflamatorios e inmunosupresores y compuestos responsables de la homeostasis de la matriz extracelular (MEC), así como moléculas antioxidantes y antiapoptóticas que tienen un papel muy importante en los procesos regenerativos (Baraniak and McDevitt, 2010).

Por lo tanto, un aspecto importante a considerar es si como se ha visto en otros estudios, la estimulación de la neuroplasticidad podría verse favorecida por la producción de BDNF, factor neurotrófico que además de poder ser inducido por las células trasplantadas, podría ser mediado por la microglía o astrocitos (Binder and Scharfman, 2004, Lipsky and Marini, 2007), actuando como un agente neuroprotector (Schabitz et al., 1997, Wu, 2005, Zhao et al., 2015b).

En nuestro estudio, se ha observado un incremento significativo en el nivel de BDNF en todos los grupos tratados. Este dato sugiere que tanto el tratamiento farmacológico como celular podría estar implicado en la estimulación de esta proteína (Figura 57). Esto es de gran importancia ya que de entre los factores neurotróficos, el BDNF tiene efectos beneficiosos en la

cognición, aprendizaje y la formación de la memoria al modular la plasticidad sináptica (Chao, 2003, Chakravarthy et al., 2006, Pardon, 2010).

3.2. Aumento de la proliferación celular como respuesta a la combinación de terapia celular y farmacológica tras daño cerebral focal

Otra consecuencia importante tras el tratamiento combinado con LA y BMDC es el ratio de proliferación en la zona dañada. Tal como se ha mostrado en resultados, hubo un incremento evidente de las células marcadas con bromodesoxiuridina (BrdU) cuando los animales dañados fueron tratados con LA y con BMDC 8 días tras la criolesión (Figura 48). Sin embargo, se ha establecido la hipótesis que las células responsables para la regeneración (BrdU⁺) del área lesionada no fueron las células BMDC trasplantadas debido a que éstas disminuyen en número y desaparecen completamente tras 16 días. De lo contrario, las células endoteliales, los astrocitos y la microglía marcadas con BrdU persistieron y mostraron una morfología y patrones de marcaje normales, sugiriendo la reconstrucción del área dañada (Figura 49). El ratio mayor de proliferación se encontró en el grupo de animales con la terapia combinada con células y antioxidante (CR+BMDC+LA), aunque el mismo número de BMDC trasplantadas se presentaron entre los grupos controles y criolesionados. Estos datos sugieren que las BMDC inyectadas podrían ayudar a mejorar la proliferación endógena local y probablemente estimular la proliferación y subsiguiente migración de las zonas circundantes (Paradells et al., 2015). Esto estaría de acuerdo con otros estudios en los que se ha observado cómo los factores neurotróficos secretados por las CMM, tienen un papel importante en crear un medioambiente favorable para la proliferación de células neurales en el área lesionada, mejorando con ello la angiogénesis, sinaptogénesis y neurogénesis en el tejido cerebral dañado (Parr et al., 2007, Khalili et al., 2014). Además del efecto que también se ha visto del LA sobre la proliferación, tras un accidente cerebrovascular simulado mediante la oclusión de la arteria cerebral media en ratas jóvenes (Choi et al., 2015). Por lo tanto, considerando que las nuevas células presentaron fenotipos de células gliales y vasos sanguíneos, se decidió analizar la respuesta glial y la angiogénesis en esta zona.

3.3. Respuesta astroglial ante la combinación de terapia celular y farmacológica tras daño cerebral focal

Evaluamos la formación de la cicatriz glial que supone un mayor impedimento para la regeneración en el SNC dañado y, como se ha mostrado en los resultados, encontramos una reducción en la cicatriz glial a los 8 días de la criolesión en todos los grupos tratados cuando comparamos con los animales que no recibieron células y/o administración del antioxidante (Figura 51). Además, la cicatriz glial estuvo incluso más enfatizada a los 16 días de la criolesión en los animales no tratados, mientras que los grupos tratados no mostraron nunca la formación de una firme cicatriz glial (Figura 52). Hay que destacar que a este punto no se detectaron células GFP⁺ en los cerebros inyectados con células, lo cual sugiere que la reconstrucción del nuevo tejido se llevó a cabo por las nuevas células del cerebro receptor. Por otra parte, el efecto detectado en la nueva organización glial se observó incluso cuando las células

trasplantadas habían desaparecido, sugiriendo que el efecto curativo fue consecuencia de la actividad y estimulación previa de las células inyectadas (Paradells et al., 2015) tal y como otros autores publicaron en estudios similares (Chopp and Li, 2002, Munoz et al., 2005, Yang et al., 2010a, Mora-Lee et al., 2012, Tate and Case, 2012b, Marquez-Curtis and Janowska-Wieczorek, 2013).

3.4. Respuesta microglial e inflamatoria ante la combinación de terapia celular y farmacológica tras daño cerebral focal

Otro punto interesante es que la ausencia de cicatriz glial tras el tratamiento de BMDC y BMDC+LA permite la presencia de células nuevas (BrdU⁺) como células de microglía, las cuales podrían estar involucradas en procesos de restauración (Rocamonde et al., 2012). De acuerdo con esto, otros estudios han demostrado que la administración sistémica de CMM tras un accidente cerebrovascular de forma experimental, incrementa la microglía activa y los astrocitos, mejorando también la secreción de factores de crecimiento/citoquinas que juegan un papel muy importante en la respuesta neuroprotectora y/o neuroregenerativa en el organismo huésped (Yang et al., 2010a). Este trabajo ha mostrado un incremento de células de microglía tras 8 días de la criolesión en todos los grupos criolesionados, siendo este incremento significativamente mayor en los animales trasplantados con las células de medula ósea (CR+BMDC y CR+BMDC+LA) (Figura 53). Sin embargo, no se puede determinar si esta microglía procede de BMDC, de la microglía residente en el cerebro o de ambos (Paradells et al., 2015). Estos descubrimientos están en concordancia con otros estudios similares donde ha sido mostrado que tras una lesión, el sistema inmune innato inicia una invasión o infiltración de microglía/macrófagos y células inmunes innatas residentes en el tejido (Giulian, 1987, Perry et al., 1995, Glezer and Rivest, 2004, Davalos et al., 2005, Nimmerjahn et al., 2005).

Se considera que la función beneficiosa de la microglía está asociada con la fagocitosis involucrada en la supervivencia neuronal (Petersen and Dailey, 2004, Shaked et al., 2004, Mitrasinovic et al., 2005), mientras que la función perjudicial procede de la secreción de citoquinas proinflamatorias (Graeber and Streit, 2010). Varios estudios han demostrado también, que el NFκB es el principal factor regulador en la patogénesis de la neuroinflamación mediada por la microglía (Jayasooriya et al., 2011, Gao et al., 2013a). Se ha sugerido, que la expresión de genes de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 (Cian et al., 2012, Lira et al., 2012) y las citoquinas proinflamatorias como el TNFα o IL-1β, son controladas por la activación de NFκB (Jung et al., 2010, Liu et al., 2011a, Chantong et al., 2012, Dalal et al., 2012, Zhu et al., 2012). Además, tal y como se ha comentado en la introducción, se han descrito acciones tanto de supervivencia como de muerte asociados al TNFα, hecho que depende del receptor que es activado, no estando del todo claro bajo qué condiciones se promueve el efecto beneficiosos a expensas del efecto de daño neuronal; por eso podemos encontrar literatura contradictoria en este campo (Tweedie et al., 2007, McCoy and Tansey, 2008, Clark et al., 2010, Frankola et al., 2011, Tobinick et al., 2012, Tuttolomondo et al., 2014). Se cree que TNFR1 está involucrado en la acción perjudicial asociado con la liberación de TNFα tras un daño cerebral y que el TNFR2 participa tardíamente en la reparación del tejido (Baratz et al., 2015).

En cuanto al NFκB, representa un marcador para el estrés celular, formado por cinco subunidades (Rel A, también llamado p65, RelB, c-Rel, p105/50, p100/52), de las cuales solo las proteínas Rel poseen funciones de activación transcripcional. Se ha visto que la reducción de la muerte celular mediante la disminución de la activación de Rel A es una ventaja para promover la regeneración axonal y el sistema de restauración (Choi et al., 2000). Así como se ha descrito que la inhibición microglial de NFκB confiere neuroprotección (Chen et al., 2005). De la misma manera se ha determinado que la activación de NFκB en los astrocitos conlleva la destrucción del tejido por agravar la neuroinflamación y el posterior daño secundario (Brambilla et al., 2005). Sin embargo, se postula también la contribución de este factor de transcripción en la creación de un medio permisivo para el crecimiento, que es específico de la subunidad (Engelmann et al., 2014).

El resultado obtenido en nuestro estudio muestra un incremento del número de células de microglía (Figura 53), sin estar correlacionado con un incremento en marcadores proinflamatorios como el NFκB o el TNFα, puesto que no se encontraron diferencias entre los grupos de estudio 8 días tras la criolesión (Figuras 55 y 56). Esto no se asemeja a otros estudios en los que se han utilizado otros antioxidantes como por el ejemplo el llevado a cabo por Song y colaboradores, en el que aplicaron resveratrol tras un modelo de lesión cerebral *in vitro* y observaron cómo tras la lesión se produce un incremento en la activación de NFκB y TNFα microglial que sin embargo disminuye tras la aplicación del antioxidante (Song et al., 2014). De manera similar, en otros estudios se observa como siguiendo un daño cerebral se produce una síntesis substancial y liberación de citoquinas proinflamatorias procedentes de astrocitos y microglía, particularmente el TNFα (Lu et al., 2009). No obstante, creemos que esto puede ser debido al tiempo de análisis, ya que en nuestro trabajo estos parámetros fueron analizados 8 días tras la criolesión y sin embargo se ha determinado como la síntesis de estas citoquinas proinflamatorias tras un TCE empieza a ser estadísticamente elevado respecto a un control a los 17 minutos tras la lesión en tejidos *post-mortem* de pacientes que murieron tras un TCE (Frugier et al., 2010). De igual forma, en otros estudios llevados a cabo en animales, el incremento mayor se realizó a las 12 horas de la lesión volviendo a valores normales a las 18 horas, por lo que hubiera sido importante analizar estos parámetros previamente (Baratz et al., 2015). Por otra parte, experimentos llevados a cabo en ratones con daño espinal o del nervio óptico muestran que la activación de NFκB ocurre en el lado del impacto en las 0,5 horas tras la lesión persistiendo durante varios días (Bethea et al., 1998). Es importante tener en cuenta que otros artículos en los que han utilizado el LA como antioxidante tras un modelo de oclusión arterial media, se ha observado una disminución en factores proinflamatorios como TNFα e IL-1β en los animales tratados con LA a los 7 días tras la lesión, que sin embargo estaban elevados en los animales no tratados pero lesionados. Sin embargo, en este caso utilizaron ratas jóvenes sabiendo que los marcadores inflamatorios cambian con la edad y el modelo animal utilizado (Choi et al., 2015).

Con todo este análisis, podemos concluir que el posible incremento de factores proinflamatorios no se da a tiempos tardíos en los que sí que encontramos alteraciones del tejido. Más estudios se deberían de realizar para determinar los niveles de estas citoquinas en estadios tempranos tras criolesión. Pues se ha observado en diferentes estudios como la

cicatriz glial, encontrada también en el presente estudio, constituye una barrera que limita la regeneración por la permanente exposición de inhibidores del crecimiento axonal y argumentan que la sobrerregulación de estas moléculas está orquestado por el NFκB. Por lo tanto, la inhibición de NFκB mejora la regeneración de los nuevos axones formados (Brambilla et al., 2005).

3.5. Respuesta microglial en el tiempo ante la combinación de terapia celular y farmacológica tras daño cerebral focal

Con el fin de evaluar la evaluación con el tiempo de la presencia de microglía tras el tratamiento celular y farmacológico, se realizó un análisis de estas células a los 16 días tras la criolesión. Se observó que esta subpoblación microglial disminuyó de manera significativa en todos los grupos tratados comparado con los niveles obtenidos a los 8 días tras la criolesión (Figura 61), sugiriendo que este incremento primario de células de microglía en los grupos tratados podría ser beneficiosa para la eliminación de desechos, una función muy importante para conseguir un ambiente proregenerativo en el SNC (Bonde et al., 2006, Brown, 2007, Mariotto et al., 2007, Mildner et al., 2007, Wang et al., 2007, Ohtaki et al., 2008).

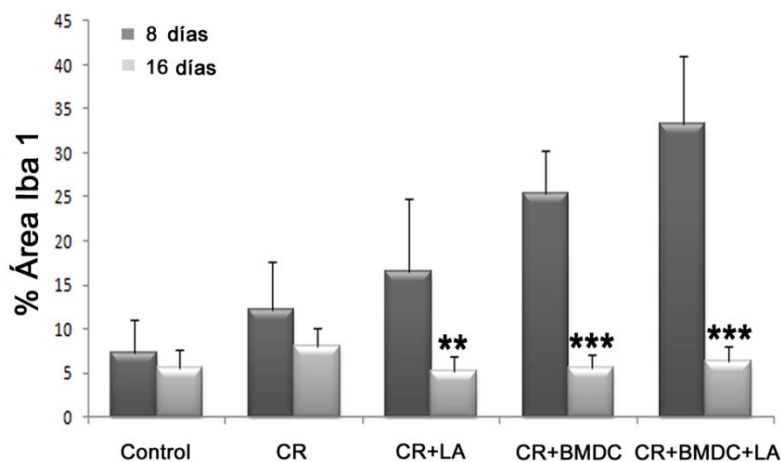


Fig.61. Comparación estadística de la cuantificación de las células Iba 1⁺ tras el tratamiento celular y farmacológico en el área lesionada 8 y 16 días tras la criolesión. El gráfico muestra la cuantificación del área ocupada por la microglía en el área dañada (% área Iba1) en cada uno de los grupos experimentales, mostrando una disminución estadística en los grupos tratados 16 días tras la criolesión cuando comparamos con los mismos grupos 8 días tras la CR. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Durante varias décadas ha habido controversia sobre el papel de la microglía en el daño del SNC (perjudicial o beneficiosa), porque por una parte, se ha sugerido que la microglía reactiva produce neurotoxinas, ERO, prostanoideos tóxicos y contribuye a la excitotoxicidad (Dimagl et al., 1999, Kim et al., 2000, Cinelli et al., 2001, Tikka and Koistinaho, 2001). Sin embargo, en otros estudios recientes se ha indicado que tanto la microglía como los macrófagos pueden tener un papel beneficioso para la neurogénesis por modular la respuesta inmune/inflamatoria y disminuir la apoptosis.

Hay que tener en cuenta que los tiempos de reacción microgliales son diferentes en el análisis realizado en nuestros estudios que aquí planteamos de rata y de ratón. Sin embargo, son similares respectivamente con los obtenidos por otros investigadores, como el llevado a cabo por Batlle y colaboradores, en el que de manera similar a nuestro estudio, encontraron el máximo valor de área ocupada por la microglía a los 15 días tras la lesión en un modelo realizado en rata (Batlle et al., 2015). De la misma forma que el realizado por Bachstetter y colaboradores, en el que sin embargo encontraron el aumento de células microgliales a los 7 días de la lesión en un modelo de lesión realizado en ratón (Bachstetter et al., 2013). Estos experimentos demuestran y confirman respuestas similares a las encontradas en nuestro trabajo tras la aplicación de terapia celular combinada o no con terapia farmacológica tras daño cerebral focal.

3.6. Respuesta angiogénica ante la combinación de terapia celular y farmacológica tras daño cerebral focal

Otro aspecto muy importante respecto a la terapia de recuperación tras una daño cerebral focal es la angiogénesis, la cual parece ser estimulada y acelerada por el tratamiento con antioxidantes y factores neuroprotectores (Dong et al., 2008, Rocamonde et al., 2012, Thau-Zuchman et al., 2012). Es importante destacar que la angiogénesis está directamente relacionada con la neurogénesis y la neuroregeneración ya que el aporte de sangre es necesario para la supervivencia y desarrollo de las nuevas neuronas (Slevin et al., 2006, Lizasoain et al., 2007). Como hemos comentado anteriormente, en un estudio previo llevado a cabo en nuestro laboratorio, se observó que el LA era capaz de estimular la angiogénesis por sí mismo, a pesar de ser bloqueado previamente el VEGF (Rocamonde et al., 2012). En la misma línea, es bien conocido el potencial de las BMDC en promover la angiogénesis (Chen et al., 2003a, Chen et al., 2003b, Guo et al., 2012) e incluso han habido estudios que han destacado cómo las células de la médula ósea secretan numerosos factores tróficos con propiedades angiogénicas (Ashwell et al., 2004).

En nuestro trabajo ha sido observado que ambos tratamientos, el LA o las BMDC, fueron capaces de estimular la angiogénesis. Además, la combinación de ambos tratamientos (BMDC+LA) incluso promovieron la angiogénesis de manera más destacada tras el daño cerebral focal (Figura 58). Cuando todos los tratamientos se compararon, no se encontraron diferencias estadísticas (en términos de área ocupada por los vasos sanguíneos, número de vasos sanguíneos o el nivel de colágeno). Sin embargo, cuando se analizó el diámetro de los vasos sanguíneos a los 16 días tras la criolesión, se observó que estos vasos eran de mayor calibre en aquellos animales tratados con BMDC+LA en comparación con los animales tratados con LA, sugiriendo que el tratamiento podría repercutir beneficiosamente sobre la disposición de las células endoteliales durante la formación de los vasos sanguíneos (Figura 52).

Es importante observar que la orientación de los nuevos vasos tras el tratamiento farmacológico y/o celular a los 8 días tras la criolesión, va dirigida perpendicularmente hacia el área dañada, de forma paralela unos con otros (Paradells et al., 2015). Esto es concordante con los datos previos obtenidos en nuestro laboratorio, en el que se mostró que el tratamiento con LA promueve la angiogénesis dirigida al área dañada a los 15 días de la criolesión

(Rocamonde et al., 2012). Y tal como hemos comentado anteriormente, en el estudio con únicamente tratamiento farmacológico, esto podría también estar en relación con otros resultados, en los que los vasos sanguíneos parecen jugar un papel como andamio para la migración de las células progenitoras neurales hacia la región de daño cerebral (Kojima et al., 2010). Además, es bien conocido que las células endoteliales juegan un papel muy importante en la reorganización y reconstrucción del parénquima cerebral dañado. Al mismo tiempo la presencia y el contacto de astrocitos con el endotelio cerebrovascular es necesario para la reconstrucción de la nueva BHE, asegurando así una correcta reperusión local (Capilla-Gonzalez et al., 2010, Cederberg and Siesjo, 2010). En este sentido, se observó una organización celular de los astrocitos diferenciados, rodeando a los nuevos vasos sanguíneos tras el tratamiento con el LA y también con BMDC y BMDC+LA (Figura 52) sugiriendo la regeneración y maduración del nuevo tejido cortical tras el daño cerebral (Paradells et al., 2015). La actividad angiogénica es crucial para una eficiente recuperación tras el daño cerebral focal, como ha sido mostrado en modelos de de rata y ratón donde los animales con una mayor densidad de vasos sanguíneos se recuperaron mejor y supervivieron más tiempo que aquellos con una densidad vascular menor (Zhang et al., 2002, Lipsky and Marini, 2007).

3.7. Respuesta neuronal ante la combinación de terapia celular y farmacológica tras daño cerebral focal

Para poder apreciar el estado neuronal se realizaron técnicas de inmunofluorescencia mediante un anticuerpo específico para MAP2 colocalizado con el anticuerpo específico de proliferación, BrdU. Hemos podido observar que el tratamiento con LA y/o BMDC estimula la migración de axones neuronales hacia la CC, al encontrar marcaje de neuronas maduras en el área adyacente a esta CC, que sin embargo no se observó en los animales no tratados. Sin embargo, parece que estas neuronas no son de nueva formación, ya que no observamos marcaje BrdU⁺. No obstante, sería interesante llevar a cabo más estudios de cuantificación de esta arborización axonal. Además, no sabemos si estas neuronas con el tiempo serán capaces de reconstruir completamente la arquitectura de la corteza cerebral y si conseguirán reconectar el circuito.

En conclusión los resultados demuestran que el trasplante de BMDC es una buena y válida estrategia para tratar el daño cerebral focal. Además, el tratamiento con BMDC tiene efectos similares que el tratamiento con LA en términos de angiogénesis, proliferación celular y formación de la cicatriz glial. Sin embargo, el tratamiento con BMDC consiste en un único tratamiento local que podría reducir los efectos secundarios sistémicos y no deseados mediados por el LA. En este sentido, BMDC podrían ser un tratamiento alternativo cuando el LA no pudiese ser prescrito.

Estos resultados demuestran que los efectos sinérgicos fueron circunscritos a un incremento de la proliferación y el número de células de microglía en el área tratada.

CONCLUSIONES

1. La administración de ácido lipoico aumenta la supervivencia celular y provoca cambios en los parámetros indicadores de estrés oxidativo (incremento del ratio GSH/GSSG) en células de cultivo primario de la corteza cerebral sometidas a estrés oxidativo.
2. La administración de ácido lipoico provoca cambios estadísticamente significativos en los parámetros indicadores de estrés oxidativo (incremento del ratio GSH/GSSG y disminución de la concentración de MDA) en homogenados de cerebro sometidos a estrés oxidativo.
3. La administración de ácido lipoico evita la formación de la cicatriz glial y como consecuencia favorece los procesos de reparación y reorganización tisular.
4. El ácido lipoico es capaz de promover la respuesta inmune temprana desarrollada por la microglía.
5. El ácido lipoico promueve la angiogénesis tras un daño cerebral focal.
6. El ácido lipoico promueve el crecimiento de axones neuronales hacia la zona dañada.
7. El tratamiento celular tiene efectos similares a los observado tras la administración de ácido lipoico en términos de respuesta astrogliar y de angiogénesis, promoviendo el crecimiento de axones neuronales hacia la zona dañada.
8. El tratamiento celular y/o farmacológico activa a las células microgliales y aumenta la expresión de BDNF, sin observarse diferencias en cuanto a citoquinas proinflamatorias como NF κ B o TNF α
9. El efecto sinérgico del tratamiento celular y farmacológico es circunscrito a un incremento de la proliferación y el número de microglía en el área dañada.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41-53.
- Adams JH, Doyle D, Ford I, Gennarelli TA, Graham DI, McLellan DR (1989) Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis and grading. *Histopathology* 15:49-59.
- Adams JH, Graham DI, Gennarelli TA (1983) Head injury in man and experimental animals: neuropathology. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 32:15-30.
- Agarwal R, Shukla GS (1999) Potential role of cerebral glutathione in the maintenance of blood-brain barrier integrity in rat. *Neurochem Res* 24:1507-1514.
- Agerman K, Hjerling-Leffler J, Blanchard MP, Scarfone E, Canlon B, Nosrat C, Ernfors P (2003) BDNF gene replacement reveals multiple mechanisms for establishing neurotrophin specificity during sensory nervous system development. *Development* 130:1479-1491.
- Akpınar D, Yargıoğlu P, Derin N, Alicigüzel Y, Sahin M, Agar A (2007) The effect of lipoic acid on lipid peroxidation and visual evoked potentials (VEPs) in rats exposed to chronic restraint stress. *The International journal of neuroscience* 117:1691-1706.
- Albert-Weissenberger C, Siren AL (2010) Experimental traumatic brain injury. *Exp Transl Stroke Med* 2:16.
- Alessandri B, Schwandt E, Kamada Y, Nagata M, Heimann A, Kempfski O (2012) The neuroprotective effect of lactate is not due to improved glutamate uptake after controlled cortical impact in rats. *J Neurotrauma* 29:2181-2191.
- Altman J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135:1127-1128.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629-634.
- Alvarez JI, Katayama T, Prat A (2013) Glial influence on the blood brain barrier. *Glia* 61:1939-1958.
- Anbari F, Khalili MA, Bahrami AR, Khoradmehr A, Sadeghian F, Fesahat F, Nabi A (2014) Intravenous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells promotes neural regeneration after traumatic brain injury. *Neural regeneration research* 9:919-923.
- Andersen JK, Mo JQ, Hom DG, Lee FY, Harnish P, Hamill RW, McNeill TH (1996) Effect of buthionine sulfoximine, a synthesis inhibitor of the antioxidant glutathione, on the murine nigrostriatal neurons. *J Neurochem* 67:2164-2171.
- Anderson CM, Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32:1-14.
- Anderson VA, Catroppa C, Rosenfeld J, Haritou F, Morse SA (2000) Recovery of memory function following traumatic brain injury in pre-school children. *Brain Inj* 14:679-692.
- Applegate MA, Humphries KM, Szweda LI (2008) Reversible inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase by hydrogen peroxide: glutathionylation and protection of lipoic acid. *Biochemistry* 47:473-478.
- Arai H, Furuya T, Yasuda T, Miura M, Mizuno Y, Mochizuki H (2004) Neurotoxic effects of lipopolysaccharide on nigral dopaminergic neurons are mediated by microglial activation, interleukin-1beta, and expression of caspase-11 in mice. *J Biol Chem* 279:51647-51653.
- Arango-Davila C, Escobar-Betancourt M, Cardona-Gomez GP, Pimienta-Jimenez H (2004) [Pathophysiology of focal cerebral ischemia: fundamental aspects and its projection on clinical practice]. *Rev Neurol* 39:156-165.
- Arivazhagan P, Shila S, Kumaran S, Panneerselvam C (2002) Effect of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in various brain regions of aged rats. *Exp Gerontol* 37:803-811.
- Arnal E, Miranda M, Barcia J, Bosch-Morell F, Romero FJ (2010) Lutein and docosahexaenoic acid prevent cortex lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rat cerebral cortex. *Neuroscience* 166:271-278.
- Arumugam TV, Phillips TM, Cheng A, Morrell CH, Mattson MP, Wan R (2010) Age and energy intake interact to modify cell stress pathways and stroke outcome. *Ann Neurol* 67:41-52.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8:963-970.
- Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N (2003) Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 5:165-176.

- Ashwell KW, Hardman C, Paxinos G (2004) The claustrum is not missing from all monotreme brains. *Brain, behavior and evolution* 64:223-241.
- Ayala A, Chaudry IH (1996) Immune dysfunction in murine polymicrobial sepsis: mediators, macrophages, lymphocytes and apoptosis. *Shock* 6 Suppl 1:S27-38.
- Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ (1998) Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3908-3913.
- Bachstetter AD, Rowe RK, Kaneko M, Goulding D, Lifshitz J, Van Eldik LJ (2013) The p38alpha MAPK regulates microglial responsiveness to diffuse traumatic brain injury. *J Neurosci* 33:6143-6153.
- Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, Regli L (2002) Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:367-378.
- Bae EH, Lee J, Ma SK, Kim IJ, Frokiaer J, Nielsen S, Kim SY, Kim SW (2009) alpha-Lipoic acid prevents cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 24:2692-2700.
- Bae EH, Lee KS, Lee J, Ma SK, Kim NH, Choi KC, Frokiaer J, Nielsen S, Kim SY, Kim SZ, Kim SH, Kim SW (2008) Effects of alpha-lipoic acid on ischemia-reperfusion-induced renal dysfunction in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 294:F272-280.
- Bains M, Hall ED (2012) Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. *Biochim Biophys Acta* 1822:675-684.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16:1-13.
- Bao X, Wei J, Feng M, Lu S, Li G, Dou W, Ma W, Ma S, An Y, Qin C, Zhao RC, Wang R (2011) Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1367:103-113.
- Baraniak PR, McDevitt TC (2010) Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regenerative medicine* 5:121-143.
- Baratz R, Tweedie D, Wang JY, Rubovitch V, Luo W, Hoffer BJ, Greig NH, Pick CG (2015) Transiently lowering tumor necrosis factor-alpha synthesis ameliorates neuronal cell loss and cognitive impairments induced by minimal traumatic brain injury in mice. *J Neuroinflammation* 12:45.
- Barcia C, Sanderson NS, Barrett RJ, Wawrowsky K, Kroeger KM, Puntel M, Liu C, Castro MG, Lowenstein PR (2008) T cells' immunological synapses induce polarization of brain astrocytes in vivo and in vitro: a novel astrocyte response mechanism to cellular injury. *PLoS One* 3:e2977.
- Barry FP, Murphy JM (2004) Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36:568-584.
- Bast A, Haenen GR (2003) Lipoic acid: a multifunctional antioxidant. *BioFactors* 17:207-213.
- Battle M, Ferri L, Andrade C, Ortega FJ, Vidal-Taboada JM, Pugliese M, Mahy N, Rodriguez MJ (2015) Astroglia-Microglia Cross Talk during Neurodegeneration in the Rat Hippocampus. *BioMed research international* 2015:102419.
- Battioni JP, Fontecave M, Jaouen M, Mansuy D (1991) Vitamin E derivatives as new potent inhibitors of microsomal lipid peroxidation. *Biochemical and biophysical research communications* 174:1103-1108.
- Bauer S, Patterson PH (2006) Leukemia inhibitory factor promotes neural stem cell self-renewal in the adult brain. *J Neurosci* 26:12089-12099.
- Beck H, Voswinckel R, Wagner S, Ziegelhoeffer T, Heil M, Helisch A, Schaper W, Acker T, Hatzopoulos AK, Plate KH (2003) Participation of bone marrow-derived cells in long-term repair processes after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:709-717.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1620-1624.
- Bellander BM, Lidman O, Ohlsson M, Meijer B, Piehl F, Svensson M (2010) Genetic regulation of microglia activation, complement expression, and neurodegeneration in a rat model of traumatic brain injury. *Exp Brain Res* 205:103-114.
- Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, LoTurco JJ (2003) Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 23:10411-10418.

- Ben-Hur T, Ben-Menachem O, Furer V, Einstein O, Mizrahi-Kol R, Grigoriadis N (2003) Effects of proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci* 24:623-631.
- Bethea JR, Castro M, Keane RW, Lee TT, Dietrich WD, Yeziarski RP (1998) Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappaB activation. *J Neurosci* 18:3251-3260.
- Biewenga GP, Haenen GR, Bast A (1997) The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol* 29:315-331.
- Bilska A, Wlodek L (2005) Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol Rep* 57:570-577.
- Binder DK, Scharfman HE (2004) Brain-derived neurotrophic factor. *Growth factors* 22:123-131.
- Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O (2002) Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2344-2349.
- Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK (2007) Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 38:817-826.
- Block ML, Hong JS (2005) Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 76:77-98.
- Bludovska M, Kotyzova D, Koutensky J, Eybl V (1999) The influence of alpha-lipoic acid on the toxicity of cadmium. *General physiology and biophysics* 18 Spec No:28-32.
- Blum B, Benvenisty N (2008) The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Advances in cancer research* 100:133-158.
- Bonde S, Ekdahl CT, Lindvall O (2006) Long-term neuronal replacement in adult rat hippocampus after status epilepticus despite chronic inflammation. *Eur J Neurosci* 23:965-974.
- Bonfanti L (2011) From hydra regeneration to human brain structural plasticity: a long trip through narrowing roads. *ScientificWorldJournal* 11:1270-1299.
- Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA (2004) Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 10 Suppl:S2-9.
- Bourbon A, Vionnet M, Leprince P, Vaissier E, Copeland J, McDonagh P, Debre P, Gandjbakhch I (2004) The effect of methylprednisolone treatment on the cardiopulmonary bypass-induced systemic inflammatory response. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 26:932-938.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu WH, Frydel B, Bramwell A, Karmally S, Green EJ, Bethea JR (2005) Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Exp Med* 202:145-156.
- Briones TL, Rogozinska M, Woods J (2011) Modulation of ischemia-induced NMDAR1 activation by environmental enrichment decreases oxidative damage. *J Neurotrauma* 28:2485-2492.
- Brown GC (2007) Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochemical Society transactions* 35:1119-1121.
- Buettner GJ, BA. (1991) *Chemistry and biochemistry of ascorbic acid*: New York; Marcell Dekker, Inc.
- Buffo A, Rolando C, Ceruti S (2010) Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol* 79:77-89.
- Burda JE, Sofroniew MV (2014) Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81:229-248.
- Busch SA, Silver J (2007) The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Current opinion in neurobiology* 17:120-127.
- Bushong EA, Martone ME, Ellisman MH (2004) Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 22:73-86.
- Bustamante J, Lodge JK, Marcocci L, Tritschler HJ, Packer L, Rihn BH (1998) Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radic Biol Med* 24:1023-1039.

- Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M (2006) Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 31:149-160.
- Cakatay U (2006) Pro-oxidant actions of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Med Hypotheses* 66:110-117.
- Cakatay U, Kayali R (2005) Plasma protein oxidation in aging rats after alpha-lipoic acid administration. *Biogerontology* 6:87-93.
- Calabrese V, Ragusa N, Antico A, Mangiameli S, Rizza V (1997) Cysteine-induced enhancement of lipid peroxidation in substantia nigra: comparative effect with exogenous administration of reduced glutathione. *Drugs Exp Clin Res* 23:25-31.
- Calio ML, Marinho DS, Ko GM, Ribeiro RR, Carbonel AF, Oyama LM, Ormanji M, Guirao TP, Calio PL, Reis LA, Simoes Mde J, Lisboa-Nascimento T, Ferreira AT, Bertocini CR (2014) Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells decreases oxidative stress, apoptosis, and hippocampal damage in brain of a spontaneous stroke model. *Free Radic Biol Med* 70:141-154.
- Campillo-Fernandez AJ, Pastor S, Abad-Collado M, Bataille L, Gomez-Ribelles JL, Meseguer-Duenas JM, Monleon-Pradas M, Artola A, Alio JL, Ruiz-Moreno JM (2007) Future design of a new keratoprosthesis. Physical and biological analysis of polymeric substrates for epithelial cell growth. *Biomacromolecules* 8:2429-2436.
- Canals S, Casarejos MJ, de Bernardo S, Rodriguez-Martin E, Mena MA (2001) Glutathione depletion switches nitric oxide neurotrophic effects to cell death in midbrain cultures: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem* 79:1183-1195.
- Cao J, Xiao Z, Jin W, Chen B, Meng D, Ding W, Han S, Hou X, Zhu T, Yuan B, Wang J, Liang W, Dai J (2013) Induction of rat facial nerve regeneration by functional collagen scaffolds. *Biomaterials* 34:1302-1310.
- Cao X, Phillis JW (1995) The free radical scavenger, alpha-lipoic acid, protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in gerbils. *Free Radic Res* 23:365-370.
- Capilla-Gonzalez V, Gil-Perotin S, Garcia-Verdugo JM (2010) Postnatal exposure to N-ethyl-N-nitrosurea disrupts the subventricular zone in adult rodents. *Eur J Neurosci* 32:1789-1799.
- Cardinaux JR, Allaman I, Magistretti PJ (2000) Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBPbeta and C/EBPdelta in astrocytes. *Glia* 29:91-97.
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM (2003) Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6:507-518.
- Carmody RJ, McGowan AJ, Cotter TG (1999) Reactive oxygen species as mediators of photoreceptor apoptosis in vitro. *Experimental cell research* 248:520-530.
- Carpenter MB (1976) Anatomical organization of the corpus striatum and related nuclei. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 55:1-36.
- Carr JH, Rodak B (2010) Atlas de hematología clínica.
- Cederberg D, Siesjo P (2010) What has inflammation to do with traumatic brain injury? *Childs Nerv Syst* 26:221-226.
- Cernak I (2005) Animal models of head trauma. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2:410-422.
- Cernak I, Vink R, Zapple DN, Cruz MI, Ahmed F, Chang T, Fricke ST, Faden AI (2004) The pathobiology of moderate diffuse traumatic brain injury as identified using a new experimental model of injury in rats. *Neurobiol Dis* 17:29-43.
- Cervantes FAA-H, Stefan (2010) Colección Nacional de Mamíferos.
- Cervantes FAH-A, Rebeca (2015) Colección Nacional de Mamíferos.
- Cian RE, Lopez-Posadas R, Drago SR, Sanchez de Medina F, Martinez-Augustin O (2012) A *Porphyra columbina* hydrolysate upregulates IL-10 production in rat macrophages and lymphocytes through an NF-kappaB, and p38 and JNK dependent mechanism. *Food chemistry* 134:1982-1990.
- Cinelli P, Madani R, Tsuzuki N, Vallet P, Arras M, Zhao CN, Osterwalder T, Rulicke T, Sonderegger P (2001) Neuroserpin, a neuroprotective factor in focal ischemic stroke. *Mol Cell Neurosci* 18:443-457.
- Circu ML, Aw TY (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48:749-762.
- Clark IA, Alleva LM, Vissel B (2010) The roles of TNF in brain dysfunction and disease. *Pharmacol Ther* 128:519-548.
- Clarkson PM, Thompson HS (2000) Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr* 72:637S-646S.

- Cleaver O, Melton DA (2003) Endothelial signaling during development. *Nat Med* 9:661-668.
- Cogle CR, Yachnis AT, Laywell ED, Zander DS, Wingard JR, Steindler DA, Scott EW (2004) Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. *Lancet* 363:1432-1437.
- Covey MV, Levison SW (2007) Leukemia inhibitory factor participates in the expansion of neural stem/progenitors after perinatal hypoxia/ischemia. *Neuroscience* 148:501-509.
- Cregut M, Durand MJ, Thouand G (2014) The diversity and functions of choline sulphatases in microorganisms. *Microb Ecol* 67:350-357.
- Cunningham C (2013) Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. *Glia* 61:71-90.
- Chakravarthy S, Saiepour MH, Bence M, Perry S, Hartman R, Couey JJ, Mansvelter HD, Levelt CN (2006) Postsynaptic TrkB signaling has distinct roles in spine maintenance in adult visual cortex and hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1071-1076.
- Chantong B, Kratschmar DV, Nashev LG, Balazs Z, Odermatt A (2012) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors differentially regulate NF-kappaB activity and pro-inflammatory cytokine production in murine BV-2 microglial cells. *J Neuroinflammation* 9:260.
- Chao MV (2000) Trophic factors: An evolutionary cul-de-sac or door into higher neuronal function? *J Neurosci Res* 59:353-355.
- Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4:299-309.
- Chatzipanteli K, Garcia R, Marcillo AE, Loores KE, Kraydieh S, Dietrich WD (2002) Temporal and segmental distribution of constitutive and inducible nitric oxide synthases after traumatic spinal cord injury: effect of aminoguanidine treatment. *J Neurotrauma* 19:639-651.
- Chen FM, Zhang M, Wu ZF (2010) Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials* 31:6279-6308.
- Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, Lu M, Gautam SC, Chopp M (2003a) Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res* 73:778-786.
- Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Chopp M (2002) Caspase inhibition by Z-VAD increases the survival of grafted bone marrow cells and improves functional outcome after MCAo in rats. *J Neurol Sci* 199:17-24.
- Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, Xu YX, Gautam SC, Lu M, Zhu Z, Chopp M (2003b) Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circulation research* 92:692-699.
- Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang Y, Wang L, Jiang H, Zhang C, Lu M, Katakowski M, Feldkamp CS, Chopp M (2003c) Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann Neurol* 53:743-751.
- Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, Chen LF, Kwon H, Yi S, Mucke L, Gan L (2005) SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. *J Biol Chem* 280:40364-40374.
- Chen XH, Iwata A, Nonaka M, Browne KD, Smith DH (2003d) Neurogenesis and glial proliferation persist for at least one year in the subventricular zone following brain trauma in rats. *J Neurotrauma* 20:623-631.
- Chesnut RM (1995) Secondary brain insults after head injury: clinical perspectives. *New Horiz* 3:366-375.
- Chew LJ, Takanohashi A, Bell M (2006) Microglia and inflammation: impact on developmental brain injuries. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 12:105-112.
- Chih CP, Roberts Jr EL (2003) Energy substrates for neurons during neural activity: a critical review of the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1263-1281.
- Chinta SJ, Andersen JK (2006) Reversible inhibition of mitochondrial complex I activity following chronic dopaminergic glutathione depletion in vitro: implications for Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 41:1442-1448.

- Chinta SJ, Kumar JM, Zhang H, Forman HJ, Andersen JK (2006) Up-regulation of gamma-glutamyl transpeptidase activity following glutathione depletion has a compensatory rather than an inhibitory effect on mitochondrial complex I activity: implications for Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 40:1557-1563.
- Chirumamilla S, Sun D, Bullock MR, Colello RJ (2002) Traumatic brain injury induced cell proliferation in the adult mammalian central nervous system. *J Neurotrauma* 19:693-703.
- Chodobski A, Zink BJ, Szmydynger-Chodobska J (2011) Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Transl Stroke Res* 2:492-516.
- Choi HJ, Kim SW, Lee SY, Hwang O (2003) Dopamine-dependent cytotoxicity of tetrahydrobiopterin: a possible mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson's disease. *J Neurochem* 86:143-152.
- Choi JS, Kim JA, Kim DH, Chun MH, Gwag BJ, Yoon SK, Joo CK (2000) Failure to activate NF-kappaB promotes apoptosis of retinal ganglion cells following optic nerve transection. *Brain Res* 883:60-68.
- Choi KH, Park MS, Kim HS, Kim KT, Kim HS, Kim JT, Kim BC, Kim MK, Park JT, Cho KH (2015) Alpha-lipoic acid treatment is neurorestorative and promotes functional recovery after stroke in rats. *Molecular brain* 8:9.
- Choi YH, Chai OH, Han EH, Choi SY, Kim HT, Song CH (2010) Lipoic acid suppresses compound 48/80-induced anaphylaxis-like reaction. *Anat Cell Biol* 43:317-324.
- Choi YS, Cho HY, Hoyt KR, Naegele JR, Obrietan K (2008) IGF-1 receptor-mediated ERK/MAPK signaling couples status epilepticus to progenitor cell proliferation in the subgranular layer of the dentate gyrus. *Glia* 56:791-800.
- Chopp M, Li Y (2002) Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol* 1:92-100.
- Chopp M, Li Y, Zhang J (2008) Plasticity and remodeling of brain. *J Neurol Sci* 265:97-101.
- Chopp M, Zhang ZG, Jiang Q (2007) Neurogenesis, angiogenesis, and MRI indices of functional recovery from stroke. *Stroke* 38:827-831.
- Chvatal A, Anderova M, Kirchhoff F (2007) Three-dimensional confocal morphometry - a new approach for studying dynamic changes in cell morphology in brain slices. *Journal of anatomy* 210:671-683.
- Dadhania VP, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB (2010) Intervention of alpha-lipoic acid ameliorates methotrexate-induced oxidative stress and genotoxicity: A study in rat intestine. *Chemico-biological interactions* 183:85-97.
- Dalal NV, Pranski EL, Tansey MG, Lah JJ, Levey AI, Betarbet RS (2012) RNF11 modulates microglia activation through NF-kappaB signalling cascade. *Neurosci Lett* 528:174-179.
- Dalazen GR, Terra M, Jacques CE, Coelho JG, Freitas R, Mazzola PN, Dutra-Filho CS (2014) Pipelicolic acid induces oxidative stress in vitro in cerebral cortex of young rats and the protective role of lipoic acid. *Metab Brain Dis* 29:175-183.
- Daneman R (2012) The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol* 72:648-672.
- Darsalia V, Allison SJ, Cusulin C, Monni E, Kuzdas D, Kallur T, Lindvall O, Kokaia Z (2011) Cell number and timing of transplantation determine survival of human neural stem cell grafts in stroke-damaged rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:235-242.
- Das S, Basu A (2008) Inflammation: a new candidate in modulating adult neurogenesis. *J Neurosci Res* 86:1199-1208.
- Datta K, Suman S, Kallakury BV, Fornace AJ, Jr. (2012) Exposure to heavy ion radiation induces persistent oxidative stress in mouse intestine. *PLoS One* 7:e42224.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8:752-758.
- Davenport R, Dennis M (2000) Neurological emergencies: acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68:277-288.
- Davies SJ, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J (1997) Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature* 390:680-683.
- De Oliveira DM, Barreto G, Galeano P, Romero JI, Holubiec MI, Badorrey MS, Capani F, Alvarez LD (2011) Paullinia cupana Mart. var. Sorbilis protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cell line against rotenone-induced cytotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 30:1382-1391.

- Deby C (1979) [Chemistry and biochemistry of polyunsaturated fatty acids]. *Acta cardiologica Supplementum* 9-19.
- DeKosky ST, Kochanek PM, Clark RS, Ciallella JR, Dixon CE (1998) Secondary Injury After Head Trauma: Subacute and Long-term Mechanisms. *Semin Clin Neuropsychiatry* 3:176-185.
- Demeurisse G (2000) Mechanisms of functional restoration after brain injury. *Acta Neurol Belg* 100:77-83.
- Derin N, Izzut-Uysal VN, Agac A, Aliciguzel Y, Demir N (2004) L-carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 55:595-606.
- Ding DC, Shyu WC, Lin SZ (2011) Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 20:5-14.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-397.
- Dixon CE, Lighthall JW, Anderson TE (1988) Physiologic, histopathologic, and cineradiographic characterization of a new fluid-percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 5:91-104.
- Doetsch F, Alvarez-Buylla A (1996) Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14895-14900.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-5061.
- Dong W, Li N, Gao D, Zhen H, Zhang X, Li F (2008) Resveratrol attenuates ischemic brain damage in the delayed phase after stroke and induces messenger RNA and protein expression for angiogenic factors. *Journal of vascular surgery* 48:709-714.
- Donnelly DJ, Popovich PG (2008) Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol* 209:378-388.
- Dringen R (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62:649-671.
- Dringen R, Hirrlinger J (2003) Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem* 384:505-516.
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
- Duffy P, Schmandke A, Sigworth J, Narumiya S, Cafferty WB, Strittmatter SM (2009) Rho-associated kinase II (ROCKII) limits axonal growth after trauma within the adult mouse spinal cord. *J Neurosci* 29:15266-15276.
- Durand M, Mach N (2013) [Alpha lipoic acid and its antioxidant against cancer and diseases of central sensitization]. *Nutr Hosp* 28:1031-1038.
- Eglitis MA, Dawson D, Park KW, Mouradian MM (1999) Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. *Neuroreport* 10:1289-1292.
- Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O (2003) Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13632-13637.
- Engelmann C, Weih F, Haenold R (2014) Role of nuclear factor kappa B in central nervous system regeneration. *Neural regeneration research* 9:707-711.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Estrada E, Uribe MC (2002) *Atlas de Histología de Vertebrados*: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Evans JL, Goldfine ID (2000) Alpha-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther* 2:401-413.
- Ewing-Cobbs L, Barnes MA, Fletcher JM (2003) Early brain injury in children: development and reorganization of cognitive function. *Dev Neuropsychol* 24:669-704.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101:890-898.

- Failla MD, Conley YP, Wagner AK (2015) Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Traumatic Brain Injury-Related Mortality: Interrelationships Between Genetics and Acute Systemic and Central Nervous System BDNF Profiles. Neurorehabilitation and neural repair.
- Fang YZ, Yang S, Wu G (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18:872-879.
- Faul M, Xu, L., Wald MM, Coronado VG (2010) Traumatic Brain injury in the United States: Emergency Department Visits, Hospitalizations, and Death, 2002-2006. National Center for Injury Prevention and Control, Centers for Disease Control and Prevention. 1-71.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24:2143-2155.
- Fawcett JW, Asher RA (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain research bulletin* 49:377-391.
- Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG (1981) Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res* 211:67-77.
- Fernandes RS, Cotter TG (1994) Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death. *Biochem Pharmacol* 48:675-681.
- Filina AA, Davydova NG, Endrikhovskii SN, Shamshinova AM (1995) [Lipoic acid as a means of metabolic therapy of open-angle glaucoma]. *Vestn Oftalmol* 111:6-8.
- Fillebeen C, Pantopoulos K (2002) Redox control of iron regulatory proteins. *Redox report : communications in free radical research* 7:15-22.
- Fitch MT, Silver J (2008) CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol* 209:294-301.
- Font MA, Arboix A, Krupinski J (2010) Angiogenesis, neurogenesis and neuroplasticity in ischemic stroke. *Curr Cardiol Rev* 6:238-244.
- Fossati P, Radtchenko A, Boyer P (2004) Neuroplasticity: from MRI to depressive symptoms. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 14 Suppl 5:S503-510.
- Fraga CG, Tappel AL (1988) Damage to DNA concurrent with lipid peroxidation in rat liver slices. *Biochem J* 252:893-896.
- Frankola KA, Greig NH, Luo W, Tweedie D (2011) Targeting TNF-alpha to elucidate and ameliorate neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *CNS & neurological disorders drug targets* 10:391-403.
- Freeman BA, Crapo JD (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47:412-426.
- Freitas RM (2009) The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. *Neurosci Lett* 455:140-144.
- Fridovich I (1983) Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 23:239-257.
- Friedenstein AJ (1976) Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 47:327-359.
- Frugier T, Morganti-Kossmann MC, O'Reilly D, McLean CA (2010) In situ detection of inflammatory mediators in post mortem human brain tissue after traumatic injury. *J Neurotrauma* 27:497-507.
- Fu HQ, Yang T, Xiao W, Fan L, Wu Y, Terrando N, Wang TL (2014) Prolonged neuroinflammation after lipopolysaccharide exposure in aged rats. *PLoS One* 9:e106331.
- Gabig TG, Babior BM (1979) The O₂(-) -forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme. *J Biol Chem* 254:9070-9074.
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.
- Gandhi S, Abramov AY (2012) Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012:428010.
- Gao F, Ding B, Zhou L, Gao X, Guo H, Xu H (2013a) Magnesium sulfate provides neuroprotection in lipopolysaccharide-activated primary microglia by inhibiting NF-kappaB pathway. *The Journal of surgical research* 184:944-950.
- Gao Z, Zhu Q, Zhang Y, Zhao Y, Cai L, Shields CB, Cai J (2013b) Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury. *Mol Neurobiol* 48:690-701.

- Gennarelli TA, Thibault LE, Adams JH, Graham DI, Thompson CJ, Marcincin RP (1982) Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate. *Ann Neurol* 12:564-574.
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G (1996) Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes care* 19:257-267.
- Giulian D (1987) Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *J Neurosci Res* 18:155-171, 132-153.
- Glezer I, Rivest S (2004) Glucocorticoids: protectors of the brain during innate immune responses. *Neuroscientist* 10:538-552.
- Go YM, Jones DP (2010) Redox clamp model for study of extracellular thiols and disulfides in redox signaling. *Methods Enzymol* 474:165-179.
- Golbidi S, Badran M, Laher I (2011) Diabetes and alpha lipoic Acid. *Frontiers in pharmacology* 2:69.
- Goldman SA, Nottebohm F (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:2390-2394.
- Gomez-Nicola D, Valle-Argos B, Pallas-Bazarra N, Nieto-Sampedro M (2011) Interleukin-15 regulates proliferation and self-renewal of adult neural stem cells. *Mol Biol Cell* 22:1960-1970.
- Gonzalez-Perez O, Gonzalez-Castaneda RE, Huerta M, Luquin S, Gomez-Pinedo U, Sanchez-Almaraz E, Navarro-Ruiz A, Garcia-Estrada J (2002) Beneficial effects of alpha-lipoic acid plus vitamin E on neurological deficit, reactive gliosis and neuronal remodeling in the penumbra of the ischemic rat brain. *Neurosci Lett* 321:100-104.
- Gonzalez-Perez O, Gutierrez-Fernandez F, Lopez-Virgen V, Collas-Aguilar J, Quinones-Hinojosa A, Garcia-Verdugo JM (2012) Immunological regulation of neurogenic niches in the adult brain. *Neuroscience* 226:270-281.
- Gonzalez-Perez O, Romero-Rodriguez R, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2009) Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. *Stem Cells* 27:2032-2043.
- Goraca A, Aslanowicz-Antkowiak K (2009) Prophylaxis with alpha-lipoic acid against lipopolysaccharide-induced brain injury in rats. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 57:141-146.
- Goraca A, Huk-Kolega H, Piechota A, Kleniewska P, Ciejka E, Skibska B (2011) Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep* 63:849-858.
- Graeber MB, Streit WJ (2010) Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:89-105.
- Graham DG (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* 14:633-643.
- Grasso S, Bramanti V, Tomassoni D, Bronzi D, Malfa G, Traini E, Napoli M, Renis M, Amenta F, Avola R (2014) Effect of lipoic acid and alpha-glyceryl-phosphorylcholine on astroglial cell proliferation and differentiation in primary culture. *J Neurosci Res* 92:86-94.
- Griffith OW (1982) Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem* 257:13704-13712.
- Griffith OW, Mulcahy RT (1999) The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 73:209-267, xii.
- Guichardant M, Valette-Talbi L, Cavadini C, Crozier G, Berger M (1994) Malondialdehyde measurement in urine. *J Chromatogr B Biomed Appl* 655:112-116.
- Guo F, Lv S, Lou Y, Tu W, Liao W, Wang Y, Deng Z (2012) Bone marrow stromal cells enhance the angiogenesis in ischaemic cortex after stroke: involvement of notch signalling. *Cell biology international* 36:997-1004.
- Guo S, Lo EH (2009) Dysfunctional cell-cell signaling in the neurovascular unit as a paradigm for central nervous system disease. *Stroke* 40:S4-7.
- Hackam AS, Strom R, Liu D, Qian J, Wang C, Otteson D, Gunatilaka T, Farkas RH, Chowers I, Kageyama M, Leveillard T, Sahel JA, Campochiaro PA, Parmigiani G, Zack DJ (2004) Identification of gene expression changes associated with the progression of retinal degeneration in the rd1 mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2929-2942.

- Hager K, Kenklies M, McAfoose J, Engel J, Munch G (2007) Alpha-lipoic acid as a new treatment option for Alzheimer's disease--a 48 months follow-up analysis. *J Neural Transm Suppl* 189-193.
- Hagg T (2009) From neurotransmitters to neurotrophic factors to neurogenesis. *Neuroscientist* 15:20-27.
- Hall ED, Andrus PK, Yonkers PA (1993) Brain hydroxyl radical generation in acute experimental head injury. *J Neurochem* 60:588-594.
- Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634-1658.
- Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI (1995) The characterization of antioxidants. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 33:601-617.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246:501-514.
- Han D, Handelman G, Marcocci L, Sen CK, Roy S, Kobuchi H, Tritschler HJ, Flohe L, Packer L (1997) Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *BioFactors* 6:321-338.
- Han D, Tritschler HJ, Packer L (1995) Alpha-lipoic acid increases intracellular glutathione in a human T-lymphocyte Jurkat cell line. *Biochemical and biophysical research communications* 207:258-264.
- Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-1394.
- Hardy K, Hunt NH (2004) Effects of a redox-active agent on lymphocyte activation and early gene expression patterns. *Free Radic Biol Med* 37:1550-1563.
- Harting MT, Baumgartner JE, Worth LL, Ewing-Cobbs L, Gee AP, Day MC, Cox CS, Jr. (2008) Cell therapies for traumatic brain injury. *Neurosurg Focus* 24:E18.
- Hastings TG, Lewis DA, Zigmond MJ (1996) Reactive dopamine metabolites and neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *Adv Exp Med Biol* 387:97-106.
- Hastings TG, Zigmond MJ (1994) Identification of catechol-protein conjugates in neostriatal slices incubated with [³H]dopamine: impact of ascorbic acid and glutathione. *J Neurochem* 63:1126-1132.
- Hatten ME, Liem RK, Shelanski ML, Mason CA (1991) Astroglia in CNS injury. *Glia* 4:233-243.
- Hauwel M, Furon E, Canova C, Griffiths M, Neal J, Gasque P (2005) Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells. *Brain Res Brain Res Rev* 48:220-233.
- Henninger N, Dutzmann S, Sicard KM, Kollmar R, Bardutzky J, Schwab S (2005) Impaired spatial learning in a novel rat model of mild cerebral concussion injury. *Exp Neurol* 195:447-457.
- Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, McCluskey ER (2003) The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 107:1359-1365.
- Hermenegildo C, Raya A, Roma J, Romero FJ (1993) Decreased glutathione peroxidase activity in sciatic nerve of alloxan-induced diabetic mice and its correlation with blood glucose levels. *Neurochem Res* 18:893-896.
- Hess DC, Abe T, Hill WD, Studdard AM, Carothers J, Masuya M, Fleming PA, Drake CJ, Ogawa M (2004) Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp Neurol* 186:134-144.
- Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, Carroll J, Brailer J, Carothers J (2002) Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells After stroke. *Stroke* 33:1362-1368.
- Hirsch EC, Breidert T, Rousselet E, Hunot S, Hartmann A, Michel PP (2003) The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991:214-228.
- Hofmann M, Mainka P, Tritschler H, Fuchs J, Zimmer G (1995) Decrease of red cell membrane fluidity and -SH groups due to hyperglycemic conditions is counteracted by alpha-lipoic acid. *Arch Biochem Biophys* 324:85-92.
- Hornykiewicz O (1966) Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol Rev* 18:925-964.

- Hsieh RJ, Kinsella JE (1989) Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. *Advances in food and nutrition research* 33:233-341.
- Huang CS, Moore WR, Meister A (1988) On the active site thiol of gamma-glutamylcysteine synthetase: relationships to catalysis, inhibition, and regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:2464-2468.
- Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.
- Iadecola C (2004) Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5:347-360.
- Iadecola C, Nedergaard M (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* 10:1369-1376.
- Ibi M, Sawada H, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Shimohama S, Akaike A (1999) Depletion of intracellular glutathione increases susceptibility to nitric oxide in mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neurochem* 73:1696-1703.
- Iosif RE, Ekdahl CT, Ahlenius H, Pronk CJ, Bonde S, Kokaia Z, Jacobsen SE, Lindvall O (2006) Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 26:9703-9712.
- Iwata N, Okazaki M, Xuan M, Kamiuchi S, Matsuzaki H, Hibino Y (2014) Orally administered ascorbic acid suppresses neuronal damage and modifies expression of SVCT2 and GLUT1 in the brain of diabetic rats with cerebral ischemia-reperfusion. *Nutrients* 6:1554-1577.
- Izumi Y, Sawada H, Sakka N, Yamamoto N, Kume T, Katsuki H, Shimohama S, Akaike A (2005) p-Quinone mediates 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neuronal death and ferrous iron accelerates the conversion of p-quinone into melanin extracellularly. *J Neurosci Res* 79:849-860.
- Jackson EL, Garcia-Verdugo JM, Gil-Perotin S, Roy M, Quinones-Hinojosa A, VandenBerg S, Alvarez-Buylla A (2006) PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* 51:187-199.
- Jacob S, Henriksen EJ, Schiemann AL, Simon I, Clancy DE, Tritschler HJ, Jung WI, Augustin HJ, Dietze GJ (1995) Enhancement of glucose disposal in patients with type 2 diabetes by alpha-lipoic acid. *Arzneimittel-Forschung* 45:872-874.
- James HE, Schneider S (1990) Cryogenic brain oedema: loss of cerebrovascular autoregulation as a cause of intracranial hypertension. Implications for treatment. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 51:79-81.
- Janero DR (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 9:515-540.
- Jareno EJ, Roma J, Romero B, Marin N, Muriach M, Johnsen S, Bosch-Morell F, Marselou L, Romero FJ (2002) Serum malondialdehyde correlates with therapeutic efficiency of high activity antiretroviral therapies (HAART) in HIV-1 infected children. *Free Radic Res* 36:341-344.
- Jayasooriya RG, Kang CH, Seo MJ, Choi YH, Jeong YK, Kim GY (2011) Exopolysaccharide of *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* downregulates LPS-induced production of NO, PGE(2), and TNF-alpha in BV2 microglia cells via suppression of the NF-kappaB pathway. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 49:2758-2764.
- Jenner P, Olanow CW (1996) Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 47:S161-170.
- Jeong HK, Ji KM, Min KJ, Choi I, Choi DJ, Jou I, Joe EH (2014) Astroglialosis is a possible player in preventing delayed neuronal death. *Mol Cells* 37:345-355.
- Jeong HK, Jou I, Joe EH (2013) Absence of Delayed Neuronal Death in ATP-Injected Brain: Possible Roles of Astroglialosis. *Exp Neurobiol* 22:308-314.
- Jeremitsky E, Omert L, Dunham CM, Protetch J, Rodriguez A (2003) Harbingers of poor outcome the day after severe brain injury: hypothermia, hypoxia, and hypoperfusion. *J Trauma* 54:312-319.
- Jesudason EP, Masilamoni JG, Jebaraj CE, Paul SF, Jayakumar R (2008) Efficacy of DL-alpha lipoic acid against systemic inflammation-induced mice: antioxidant defense system. *Molecular and cellular biochemistry* 313:113-123.

- Jha N, Jurma O, Lalli G, Liu Y, Pettus EH, Greenamyre JT, Liu RM, Forman HJ, Andersen JK (2000) Glutathione depletion in PC12 results in selective inhibition of mitochondrial complex I activity. Implications for Parkinson's disease. *J Biol Chem* 275:26096-26101.
- Ji D, Majid AS, Yin ZQ (2013) alpha-Lipoic acid attenuates light insults to neurones. *Biol Pharm Bull* 36:1060-1067.
- Johansson S, Price J, Modo M (2008) Effect of inflammatory cytokines on major histocompatibility complex expression and differentiation of human neural stem/progenitor cells. *Stem Cells* 26:2444-2454.
- Johnsen-Soriano S, Genoves JM, Romero B, Garcia-Delpech S, Muriach M, Sancho-Tello M, Bosch-Morell F, Romero FJ (2007) [Chronic ethanol feeding induces oxidative stress in the rat retina: treatment with the antioxidant ebselen]. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia* 82:757-762.
- Jones CP, Rankin SM (2011) Bone marrow-derived stem cells and respiratory disease. *Chest* 140:205-211.
- Jones NC, Prior MJ, Burden-Teh E, Marsden CA, Morris PG, Murphy S (2005) Antagonism of the interleukin-1 receptor following traumatic brain injury in the mouse reduces the number of nitric oxide synthase-2-positive cells and improves anatomical and functional outcomes. *Eur J Neurosci* 22:72-78.
- Jones W, Li X, Qu ZC, Perriott L, Whitesell RR, May JM (2002) Uptake, recycling, and antioxidant actions of alpha-lipoic acid in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 33:83-93.
- Jung WK, Lee DY, Park C, Choi YH, Choi I, Park SG, Seo SK, Lee SW, Yea SS, Ahn SC, Lee CM, Park WS, Ko JH, Choi IW (2010) Cilostazol is anti-inflammatory in BV2 microglial cells by inactivating nuclear factor-kappaB and inhibiting mitogen-activated protein kinases. *British journal of pharmacology* 159:1274-1285.
- Kadam SD, Mulholland JD, McDonald JW, Comi AM (2008) Neurogenesis and neuronal commitment following ischemia in a new mouse model for neonatal stroke. *Brain Res* 1208:35-45.
- Kaengkan P, Baek SE, Kim JY, Kam KY, Do BR, Lee ES, Kang SG (2013) Administration of mesenchymal stem cells and ziprasidone enhanced amelioration of ischemic brain damage in rats. *Mol Cells* 36:534-541.
- Kagan VE, Shvedova A, Serbinova E, Khan S, Swanson C, Powell R, Packer L (1992) Dihydrolipoic acid—a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem Pharmacol* 44:1637-1649.
- Kang W, Balordi F, Su N, Chen L, Fishell G, Hebert JM (2014) Astrocyte activation is suppressed in both normal and injured brain by FGF signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E2987-2995.
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.
- Karin M, Lin A (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3:221-227.
- Kas J, Blatna J (1986) Phospholipids in foodstuffs. *Acta Univ Carol Med (Praha)* 32:81-92.
- Katakowski M, Chen J, Zhang ZG, Santra M, Wang Y, Chopp M (2007) Stroke-induced subventricular zone proliferation is promoted by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme protease activity. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:669-678.
- Kato T, Yokouchi K, Fukushima N, Kawagishi K, Li Z, Moriizumi T (2001) Continual replacement of newly-generated olfactory neurons in adult rats. *Neurosci Lett* 307:17-20.
- Kaur C, Ling EA (2008) Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system. *Curr Med Chem* 15:3068-3080.
- Kawabori M, Kuroda S, Sugiyama T, Ito M, Shichinohe H, Houkin K, Kuge Y, Tamaki N (2012) Intracerebral, but not intravenous, transplantation of bone marrow stromal cells enhances functional recovery in rat cerebral infarct: an optical imaging study. *Neuropathology* 32:217-226.
- Kawano H, Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Yoshioka N, Li HP, Kawamura K, Li Y, Raisman G (2012) Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res* 349:169-180.
- Kehrer JP (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 23:21-48.

- Kerman M, Cirak B, Ozguner MF, Dagtekin A, Sutcu R, Altuntas I, Delibas N (2005) Does melatonin protect or treat brain damage from traumatic oxidative stress? *Exp Brain Res* 163:406-410.
- Kernie SG, Erwin TM, Parada LF (2001) Brain remodeling due to neuronal and astrocytic proliferation after controlled cortical injury in mice. *J Neurosci Res* 66:317-326.
- Khalili MA, Sadeghian-Nodoushan F, Fesahat F, Mir-Esmaili SM, Anvari M, Hekmati-Moghadam SH (2014) Mesenchymal stem cells improved the ultrastructural morphology of cerebral tissues after subarachnoid hemorrhage in rats. *Exp Neurobiol* 23:77-85.
- Kiernan J (2000) *El sistema nervioso humano: Mcgraw-Hill Interamericana*.
- Kil HY, Zhang J, Piantadosi CA (1996) Brain temperature alters hydroxyl radical production during cerebral ischemia/reperfusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:100-106.
- Kim BW, Koppula S, Hong SS, Jeon SB, Kwon JH, Hwang BY, Park EJ, Choi DK (2013) Regulation of microglia activity by glaucocalyxin-A: attenuation of lipopolysaccharide-stimulated neuroinflammation through NF-kappaB and p38 MAPK signaling pathways. *PLoS One* 8:e55792.
- Kim WG, Mohny RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS (2000) Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 20:6309-6316.
- Klatzo I, Piraux A, Laskowski EJ (1958) The relationship between edema, blood-brain-barrier and tissue elements in a local brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 17:548-564.
- Klementiev B, Novikova T, Korshunova I, Berezin V, Bock E (2008) The NCAM-derived P2 peptide facilitates recovery of cognitive and motor function and ameliorates neuropathology following traumatic brain injury. *Eur J Neurosci* 27:2885-2896.
- Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA (2009) Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy* 11:377-391.
- Kojima T, Hirota Y, Ema M, Takahashi S, Miyoshi I, Okano H, Sawamoto K (2010) Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells* 28:545-554.
- Kokaia Z, Lindvall O (2003) Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Current opinion in neurobiology* 13:127-132.
- Kokaia Z, Martino G, Schwartz M, Lindvall O (2012) Cross-talk between neural stem cells and immune cells: the key to better brain repair? *Nat Neurosci* 15:1078-1087.
- Kokovay E, Li L, Cunningham LA (2006) Angiogenic recruitment of pericytes from bone marrow after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:545-555.
- Kolb B, Whishaw IQ (1998) Brain plasticity and behavior. *Annual review of psychology* 49:43-64.
- Komeima K, Rogers BS, Campochiaro PA (2007) Antioxidants slow photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *J Cell Physiol* 213:809-815.
- Komeima K, Rogers BS, Lu L, Campochiaro PA (2006) Antioxidants reduce cone cell death in a model of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11300-11305.
- Koshinaga M, Katayama Y, Fukushima M, Oshima H, Suma T, Takahata T (2000) Rapid and widespread microglial activation induced by traumatic brain injury in rat brain slices. *J Neurotrauma* 17:185-192.
- Kozlov AV, Gille L, Staniek K, Nohl H (1999) Dihydrolipoic acid maintains ubiquinone in the antioxidant active form by two-electron reduction of ubiquinone and one-electron reduction of ubisemiquinone. *Arch Biochem Biophys* 363:148-154.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.
- Krupinski J, Issa R, Bujny T, Slevin M, Kumar P, Kumar S, Kaluza J (1997) A putative role for platelet-derived growth factor in angiogenesis and neuroprotection after ischemic stroke in humans. *Stroke* 28:564-573.
- Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S (1996) Immunocytochemical studies of cellular reaction in human ischemic brain stroke. MAB anti-CD68 stains macrophages, astrocytes and microglial cells in infarcted area. *Folia Neuropathol* 34:17-24.
- Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM (1994) Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* 25:1794-1798.

- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH (1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17:5820-5829.
- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (2008) *Patologia humana*: Elsevier, 8 edition.
- Kuroda S, Shichinohe H, Houkin K, Iwasaki Y (2011) Autologous bone marrow stromal cell transplantation for central nervous system disorders - recent progress and perspective for clinical application. *J Stem Cells Regen Med* 7:2-13.
- Kwiecien B, Dudek M, Bilska-Wilkosz A, Knutelska J, Bednarski M, Kwiecien I, Zygmunt M, Iciek M, Sokolowska-Jezewicz M, Sapa J, Wlodek L (2013) In vivo anti-inflammatory activity of lipoic acid derivatives in mice. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 67:331-338.
- Laki K, Horvath B, Klatzo I (1958) On the relationship between myosin and tropomyosin A. *Biochim Biophys Acta* 28:656-657.
- Lancelot E, Callebert J, Lerouet D, Revaud ML, Boulu RG, Plotkine M (1995) Role of the L-arginine-nitric oxide pathway in the basal hydroxyl radical production in the striatum of awake rats as measured by brain microdialysis. *Neurosci Lett* 202:21-24.
- Langston JW, Forno LS, Tetrad J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D (1999) Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 46:598-605.
- Larghero P, Vene R, Minghelli S, Travaini G, Morini M, Ferrari N, Pfeiffer U, Noonan DM, Albini A, Benelli R (2007) Biological assays and genomic analysis reveal lipoic acid modulation of endothelial cell behavior and gene expression. *Carcinogenesis* 28:1008-1020.
- Laskin DL, Pendino KJ (1995) Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:655-677.
- Lee DW, Kaur D, Chinta SJ, Rajagopalan S, Andersen JK (2009) A disruption in iron-sulfur center biogenesis via inhibition of mitochondrial dithiol glutaredoxin 2 may contribute to mitochondrial and cellular iron dysregulation in mammalian glutathione-depleted dopaminergic cells: implications for Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 11:2083-2094.
- Lee HS, Jung KK, Cho JY, Rhee MH, Hong S, Kwon M, Kim SH, Kang SY (2007) Neuroprotective effect of curcumin is mainly mediated by blockade of microglial cell activation. *Pharmazie* 62:937-942.
- Lee SJ, Hou J, Benveniste EN (1998) Transcriptional regulation of intercellular adhesion molecule-1 in astrocytes involves NF-kappaB and C/EBP isoforms. *J Neuroimmunol* 92:196-207.
- Lei XG (2002) In vivo antioxidant role of glutathione peroxidase: evidence from knockout mice. *Methods Enzymol* 347:213-225.
- Lemmens R, Steinberg GK (2013) Stem cell therapy for acute cerebral injury: what do we know and what will the future bring? *Curr Opin Neurol* 26:617-625.
- Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI (2000) Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J Neurosci* 20:4615-4626.
- Leventhal C, Rafii S, Rafii D, Shahar A, Goldman SA (1999) Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Mol Cell Neurosci* 13:450-464.
- Li L, Jiang Q, Ding G, Zhang L, Zhang ZG, Li Q, Panda S, Lu M, Ewing JR, Chopp M (2010) Effects of administration route on migration and distribution of neural progenitor cells transplanted into rats with focal cerebral ischemia, an MRI study. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:653-662.
- Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Katakowski M, Zhang LJ, Lu M, Janakiraman N, Chopp M (2002) Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 59:514-523.
- Li Y, Chen J, Chopp M (2001a) Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. *Cell Transplant* 10:31-40.
- Li Y, Chen J, Wang L, Lu M, Chopp M (2001b) Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology* 56:1666-1672.
- Li Y, Chen J, Zhang CL, Wang L, Lu D, Katakowski M, Gao Q, Shen LH, Zhang J, Lu M, Chopp M (2005) Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia* 49:407-417.
- Li Y, Chopp M (2009) Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 456:120-123.

- Lindenau J, Noack H, Possel H, Asayama K, Wolf G (2000) Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. *Glia* 29:25-34.
- Lipsky RH, Marini AM (2007) Brain-derived neurotrophic factor in neuronal survival and behavior-related plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 1122:130-143.
- Lira FS, Rosa JC, Pimentel GD, Seelaender M, Damaso AR, Oyama LM, do Nascimento CO (2012) Both adiponectin and interleukin-10 inhibit LPS-induced activation of the NF-kappaB pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Cytokine* 57:98-106.
- Liu D, Wang Z, Liu S, Wang F, Zhao S, Hao A (2011a) Anti-inflammatory effects of fluoxetine in lipopolysaccharide(LPS)-stimulated microglial cells. *Neuropharmacology* 61:592-599.
- Liu W, Chen Q, Liu J, Liu KJ (2011b) Normobaric hyperoxia protects the blood brain barrier through inhibiting Nox2 containing NADPH oxidase in ischemic stroke. *Medical gas research* 1:22.
- Liu Y, Hao W, Letiembre M, Walter S, Kulanga M, Neumann H, Fassbender K (2006) Suppression of microglial inflammatory activity by myelin phagocytosis: role of p47-PHOX-mediated generation of reactive oxygen species. *J Neurosci* 26:12904-12913.
- Liuzzi FJ, Lasek RJ (1987) Astrocytes block axonal regeneration in mammals by activating the physiological stop pathway. *Science* 237:642-645.
- Lizasoain I MM, Fernández-López D, Pradillo JM, Sobrino T, Castillo J. (2007) Plasticidad, neurogénesis y angiogénesis: Medica Books.
- Lizasoain I, Moro MA, Fernández-López D, Pradillo JM, Sobrino T, Castillo J (2007) Plasticidad, neurogénesis y angiogénesis. In: *Fisiopatología de la isquemia cerebral Barcelona (España)*.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Lok J, Gupta P, Guo S, Kim WJ, Whalen MJ, van Leyen K, Lo EH (2007) Cell-cell signaling in the neurovascular unit. *Neurochem Res* 32:2032-2045.
- Longhi L, Roncati Zanier E, Valeriani V, Ghisoni L, Besozzi A, Ferrari C, Stocchetti N (2003) [Brain vulnerability and its modulation]. *Minerva anestesologica* 69:227-231.
- Lovell-Badge R (2001) The future for stem cell research. *Nature* 414:88-91.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lu D, Mahmood A, Qu C, Goussev A, Schallert T, Chopp M (2005) Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 22:1011-1017.
- Lu D, Mahmood A, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M (2001) Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport* 12:559-563.
- Lu J, Goh SJ, Tng PY, Deng YY, Ling EA, Moochhala S (2009) Systemic inflammatory response following acute traumatic brain injury. *Frontiers in bioscience* 14:3795-3813.
- Lu SC (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* 13:1169-1183.
- Luissint AC, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO (2012) Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS* 9:23.
- Luskin MB (1998) Neuroblasts of the postnatal mammalian forebrain: their phenotype and fate. *J Neurobiol* 36:221-233.
- Lynch MA (2001) Lipoic acid confers protection against oxidative injury in non-neuronal and neuronal tissue. *Nutritional neuroscience* 4:419-438.
- Madamanchi NR, Hakim ZS, Runge MS (2005) Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *J Thromb Haemost* 3:254-267.
- Magnus T, Chan A, Grauer O, Toyka KV, Gold R (2001) Microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T cells leads to down-regulation of microglial immune activation. *J Immunol* 167:5004-5010.
- Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Chopp M (2006) Long-term recovery after bone marrow stromal cell treatment of traumatic brain injury in rats. *J Neurosurg* 104:272-277.

- Maitra I, Serbinova E, Trischler H, Packer L (1995) Alpha-lipoic acid prevents buthionine sulfoximine-induced cataract formation in newborn rats. *Free Radic Biol Med* 18:823-829.
- Mandelkow E, Song YH, Mandelkow EM (1995) The microtubule lattice--dynamic instability of concepts. *Trends in cell biology* 5:262-266.
- Marchetti B, Abbracchio MP (2005) To be or not to be (inflamed)--is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Pharmacol Sci* 26:517-525.
- Margulies SS, Thibault LE, Gennarelli TA (1990) Physical model simulations of brain injury in the primate. *J Biomech* 23:823-836.
- Mariotto S, Suzuki Y, Persichini T, Colasanti M, Suzuki H, Cantoni O (2007) Cross-talk between NO and arachidonic acid in inflammation. *Curr Med Chem* 14:1940-1944.
- Marley R, Holt S, Fernando B, Harry D, Anand R, Goodier D, Davies S, Moore K (1999) Lipoic acid prevents development of the hyperdynamic circulation in anesthetized rats with biliary cirrhosis. *Hepatology* 29:1358-1363.
- Marmarou A, Hochwald G, Nakamura T, Tanaka K, Weaver J, Dunbar J (1994) Brain edema resolution by CSF pathways and brain vasculature in cats. *Am J Physiol* 267:H514-520.
- Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A (2013) Enhancing the migration ability of mesenchymal stromal cells by targeting the SDF-1/CXCR4 axis. *BioMed research international* 2013:561098.
- Marti HH, Risau W (1999) Angiogenesis in ischemic disease. *Thromb Haemost* 82 Suppl 1:44-52.
- Martin-Lopez E, Garcia-Marques J, Nunez-Llaves R, Lopez-Mascaraque L (2013) Clonal astrocytic response to cortical injury. *PLoS One* 8:e74039.
- Martinez-Ramos C, Gomez-Pinedo U, Esparza MA, Soria JM, Barcia JA, Monleon Pradas M (2015) Neural tissue regeneration in experimental brain injury model with channeled scaffolds of acrylate copolymers. *Neurosci Lett* 598:96-101.
- Martinez-Ramos C, Lainez S, Sancho F, Garcia Esparza MA, Planells-Cases R, Garcia Verdugo JM, Gomez Ribelles JL, Salmeron Sanchez M, Monleon Pradas M, Barcia JA, Soria JM (2008) Differentiation of postnatal neural stem cells into glia and functional neurons on laminin-coated polymeric substrates. *Tissue Eng Part A* 14:1365-1375.
- Martinez-Ramos C, Valles-Lluch A, Verdugo JM, Ribelles JL, Barcia Albacar JA, Orts AB, Soria Lopez JM, Pradas MM (2012) Channeled scaffolds implanted in adult rat brain. *J Biomed Mater Res A* 100:3276-3286.
- Martino G, Pluchino S (2006) The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 7:395-406.
- Maruichi K, Kuroda S, Chiba Y, Hokari M, Shichinohe H, Hida K, Iwasaki Y (2009) Transplanted bone marrow stromal cells improves cognitive dysfunction due to diffuse axonal injury in rats. *Neuropathology* 29:422-432.
- Mattson MP (2012) Energy intake and exercise as determinants of brain health and vulnerability to injury and disease. *Cell metabolism* 16:706-722.
- McAllister TW (2011) Neurobiological consequences of traumatic brain injury. *Dialogues in clinical neuroscience* 13:287-300.
- McCord JM, Roy RS (1982) The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 60:1346-1352.
- McCoy MK, Tansey MG (2008) TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 5:45.
- McIntosh TK, Smith DH, Meaney DF, Kotapka MJ, Gennarelli TA, Graham DI (1996) Neuropathological sequelae of traumatic brain injury: relationship to neurochemical and biomechanical mechanisms. *Lab Invest* 74:315-342.
- McIntosh TK, Vink R, Noble L, Yamakami I, Fernyak S, Soares H, Faden AL (1989) Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience* 28:233-244.
- McKay R (2000) Stem cells and the cellular organization of the brain. *J Neurosci Res* 59:298-300.
- McKee JA, Brewer RP, Macy GE, Borel CO, Reynolds JD, Warner DS (2005) Magnesium neuroprotection is limited in humans with acute brain injury. *Neurocrit Care* 2:342-351.

- McPherson CA, Aoyama M, Harry GJ (2011) Interleukin (IL)-1 and IL-6 regulation of neural progenitor cell proliferation with hippocampal injury: differential regulatory pathways in the subgranular zone (SGZ) of the adolescent and mature mouse brain. *Brain Behav Immun* 25:850-862.
- Mehta SL, Manhas N, Raghubir R (2007) Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain research reviews* 54:34-66.
- Meister A (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263:17205-17208.
- Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A (2006) Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26:7907-7918.
- Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI (2002) Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol* 451:170-188.
- Merida S, Sancho-Tello M, Muriach M, Miranda M, Navea A, Bosch-Morell F (2013) Lipoic acid lessens Th1-mediated inflammation in lipopolysaccharide-induced uveitis reducing selectively Th1 lymphocytes-related cytokines release. *Free Radic Res* 47:593-601.
- Merrill JE, Benveniste EN (1996) Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci* 19:331-338.
- Mescher AL, Neff AW (2006) Limb regeneration in amphibians: immunological considerations. *ScientificWorldJournal* 6 Suppl 1:1-11.
- Michael T, Madigan JMM, Jack Parker (2003) *Brock Biology of Microorganisms*.
- Micheau A, Hoa D (eds.) (2009) *NeuroAnatomical atlas*.
- Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch UK, Mack M, Heikenwalder M, Bruck W, Priller J, Prinz M (2007) Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 10:1544-1553.
- Miljan EA, Sinden JD (2009) Stem cell treatment of ischemic brain injury. *Curr Opin Mol Ther* 11:394-403.
- Miller RJ, Rostene W, Apartis E, Banisadr G, Biber K, Milligan ED, White FA, Zhang J (2008) Chemokine action in the nervous system. *J Neurosci* 28:11792-11795.
- Min KJ, Jeong HK, Kim B, Hwang DH, Shin HY, Nguyen AT, Kim JH, Jou I, Kim BG, Joe EH (2012) Spatial and temporal correlation in progressive degeneration of neurons and astrocytes in contusion-induced spinal cord injury. *J Neuroinflammation* 9:100.
- Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C (2002) The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 202:13-23.
- Ming GL, Song H (2011) Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70:687-702.
- Minotti G, Aust SD (1987) The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chemistry and physics of lipids* 44:191-208.
- Miranda M, Arnal E, Ahuja S, Alvarez-Nolting R, Lopez-Pedrajas R, Ekstrom P, Bosch-Morell F, van Veen T, Romero FJ (2010) Antioxidants rescue photoreceptors in rd1 mice: Relationship with thiol metabolism. *Free Radic Biol Med* 48:216-222.
- Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareno E, Bosch-Morell F, Romero FJ, Silvestre D (2004) Oxidative status of human milk and its variations during cold storage. *BioFactors* 20:129-137.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008) Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3:265-278.
- Mitrasinovic OM, Grattan A, Robinson CC, Lapustea NB, Poon C, Ryan H, Phong C, Murphy GM, Jr. (2005) Microglia overexpressing the macrophage colony-stimulating factor receptor are neuroprotective in a microglial-hippocampal organotypic coculture system. *J Neurosci* 25:4442-4451.
- Moini H, Packer L, Saris NE (2002) Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol* 182:84-90.
- Monje ML, Toda H, Palmer TD (2003) Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302:1760-1765.
- Montaner J (2009) Tratamiento del ictus isquémico.

- Montiel-Eulefi EB-D, L.; Leal, P.; Roa, J.C.; Risopatrón, J.; Salazar, L.A.; Romero, F.; Sánchez, R. (2011) Pericytes: New approaches in regenerative therapy, verebrovascular pathology and cancer. *Int J Morphol* 29:769-781.
- Mora-Lee S, Sirerol-Piquer MS, Gutierrez-Perez M, Gomez-Pinedo U, Roobrouck VD, Lopez T, Casado-Nieto M, Abizanda G, Rabena MT, Verfaillie C, Prosper F, Garcia-Verdugo JM (2012) Therapeutic effects of hMAPC and hMSC transplantation after stroke in mice. *PLoS One* 7:e43683.
- Morales DM, Marklund N, Lebold D, Thompson HJ, Pitkanen A, Maxwell WL, Longhi L, Laurer H, Maegele M, Neugebauer E, Graham DI, Stocchetti N, McIntosh TK (2005) Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience* 136:971-989.
- Mounsey RB, Teismann P (2012) Chelators in the treatment of iron accumulation in Parkinson's disease. *Int J Cell Biol* 2012:983245.
- Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG (2005) ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25:274-278.
- Muellner A, Benz M, Kloss CU, Mautes A, Burggraf D, Hamann GF (2003) Microvascular basal lamina antigen loss after traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 20:745-754.
- Muller HW, Seifert W (1982) A neurotrophic factor (NTF) released from primary glial cultures supports survival and fiber outgrowth of cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 8:195-204.
- Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, Spees JL, Prockop DJ (2005) Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18171-18176.
- Munoz P, Huenchuguala S, Paris I, Segura-Aguilar J (2012) Dopamine oxidation and autophagy. *Parkinsons Dis* 2012:920953.
- Muriach M, Bosch-Morell F, Alexander G, Blomhoff R, Barcia J, Arnal E, Almansa I, Romero FJ, Miranda M (2006) Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. *Free Radic Biol Med* 41:979-984.
- Muyderman H, Nilsson M, Sims NR (2004) Highly selective and prolonged depletion of mitochondrial glutathione in astrocytes markedly increases sensitivity to peroxynitrite. *J Neurosci* 24:8019-8028.
- Mythri RB, Venkateshappa C, Harish G, Mahadevan A, Muthane UB, Yasha TC, Srinivas Bharath MM, Shankar SK (2011) Evaluation of markers of oxidative stress, antioxidant function and astrocytic proliferation in the striatum and frontal cortex of Parkinson's disease brains. *Neurochem Res* 36:1452-1463.
- Mytilineou C, Kramer BC, Yabut JA (2002) Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism Relat Disord* 8:385-387.
- Nacmias B, Piccini C, Bagnoli S, Tedde A, Cellini E, Bracco L, Sorbi S (2004) Brain-derived neurotrophic factor, apolipoprotein E genetic variants and cognitive performance in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 367:379-383.
- Nag S (1996) Cold-injury of the cerebral cortex: immunolocalization of cellular proteins and blood-brain barrier permeability studies. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:880-888.
- Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Bachelin C, Baron-Van Evercooren A (1999) Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci* 11:4357-4366.
- Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, Tanaka K, Niwa M (2009) A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int* 54:253-263.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M (2002) Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110:429-441.
- Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420:846-852.
- Netter FH (2005) Sistema nervioso. Anatomía y fisiología. Barcelona (España): Masson, S.A.
- Nicotra A, Lupo G, Giurdanella G, Anfuso CD, Ragusa N, Tirolo C, Marchetti B, Alberghina M (2005) MAPKs mediate the activation of cytosolic phospholipase A2 by amyloid beta(25-35) peptide in bovine retina pericytes. *Biochim Biophys Acta* 1733:172-186.

- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318.
- Ninkovic MB, Malicevic ZM, Jelenkovic A, Dukic MM, Jovanovic MD, Stevanovic ID (2009) Nitric oxide synthase inhibitors partially inhibit oxidative stress development in the rat brain during sepsis provoked by cecal ligation and puncture. *General physiology and biophysics* 28 Spec No:243-250.
- Niranjan R, Nath C, Shukla R (2010) The mechanism of action of MPTP-induced neuroinflammation and its modulation by melatonin in rat astrocytoma cells, C6. *Free Radic Res* 44:1304-1316.
- Nishino A, Suzuki M, Ohtani H, Motohashi O, Umezawa K, Nagura H, Yoshimoto T (1993) Thrombin may contribute to the pathophysiology of central nervous system injury. *J Neurotrauma* 10:167-179.
- Nitta SK, Numata K (2013) Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. *Int J Mol Sci* 14:1629-1654.
- Nottebohm F (1989) From bird song to neurogenesis. *Scientific American* 260:74-79.
- Oboh G, Olasehinde TA, Ademosun AO (2014) Essential oil from lemon peels inhibit key enzymes linked to neurodegenerative conditions and pro-oxidant induced lipid peroxidation. *Journal of oleo science* 63:373-381.
- Odabasoglu F, Halici Z, Aygun H, Halici M, Atalay F, Cakir A, Cadirci E, Bayir Y, Suleyman H (2011) alpha-Lipoic acid has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: an experimental study in rats with carrageenan-induced acute and cotton pellet-induced chronic inflammations. *Br J Nutr* 105:31-43.
- Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST (2006) A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* 26:13007-13016.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358.
- Ohtaki H, Ylostalo JH, Foraker JE, Robinson AP, Reger RL, Shioda S, Prockop DJ (2008) Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14638-14643.
- Olesen SP (1987) Free oxygen radicals decrease electrical resistance of microvascular endothelium in brain. *Acta physiologica Scandinavica* 129:181-187.
- Olsen ML, Higashimori H, Campbell SL, Hablitz JJ, Sontheimer H (2006) Functional expression of Kir4.1 channels in spinal cord astrocytes. *Glia* 53:516-528.
- Olsson M, Bentlage C, Wictorin K, Campbell K, Bjorklund A (1997) Extensive migration and target innervation by striatal precursors after grafting into the neonatal striatum. *Neuroscience* 79:57-78.
- Oshima K, Teo DT, Senn P, Starlinger V, Heller S (2007) LIF promotes neurogenesis and maintains neural precursors in cell populations derived from spiral ganglion stem cells. *BMC Dev Biol* 7:112.
- Otero L, Zurita M, Bonilla C, Aguayo C, Rico MA, Vaquero J (2012) [Perspectives of cell therapy in sequelae from cerebrovascular accidents]. *Neurocirugia (Astur)* 23:193-199.
- Ou P, Tritschler HJ, Wolff SP (1995) Thiocctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant? *Biochem Pharmacol* 50:123-126.
- Ozbal S, Cankurt U, Tugyan K, Pekcetin C, Sisman AR, Gunduz K, Micili SC (2015) The effects of alpha-lipoic acid on immature rats with traumatic brain injury. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* 90:206-215.
- Ozdemir D, Uysal N, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A, Topcu A, Ozdemir N, Duman M, Semin I, Ozkan H (2005) Effect of melatonin on brain oxidative damage induced by traumatic brain injury in immature rats. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 54:631-637.
- Packer L, Cadenas E (2011) Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 48:26-32.
- Packer L, Kraemer K, Rimbach G (2001) Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 17:888-895.
- Packer L, Tritschler HJ, Wessel K (1997) Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med* 22:359-378.
- Packer L, Witt EH, Tritschler HJ (1995a) alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 19:227-250.

- Packer L, Witt EH, Tritschler HJ, Wessel K, Ulrich H (1995b) Antioxidant properties and clinical implications of alpha-lipoic acid. In: *Biothols in health and disease*, pp 479-484 Dekker, New York.
- Pakulska MM, Ballios BG, Shoichet MS (2012) Injectable hydrogels for central nervous system therapy. *Biomed Mater* 7:024101.
- Panigrahi M, Sadguna Y, Shivakumar BR, Kolluri SV, Roy S, Packer L, Ravindranath V (1996) alpha-Lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 717:184-188.
- Paradells S, Zipancic I, Martinez-Losa MM, Garcia Esparza MA, Bosch-Morell F, Alvarez-Dolado M, Soria JM (2015) Lipoic acid and bone marrow derived cells therapy induce angiogenesis and cell proliferation after focal brain injury. *Brain Inj* 29:380-395.
- Pardon MC (2010) Role of neurotrophic factors in behavioral processes: implications for the treatment of psychiatric and neurodegenerative disorders. *Vitamins and hormones* 82:185-200.
- Park WS, Jung WK, Lee DY, Moon C, Yea SS, Park SG, Seo SK, Park C, Choi YH, Kim GY, Choi JS, Choi IW (2010) Cilostazol protects mice against endotoxin shock and attenuates LPS-induced cytokine expression in RAW 264.7 macrophages via MAPK inhibition and NF-kappaB inactivation: not involved in cAMP mechanisms. *International immunopharmacology* 10:1077-1085.
- Parr AM, Tator CH, Keating A (2007) Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone marrow transplantation* 40:609-619.
- Paton JA, Nottebohm FN (1984) Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225:1046-1048.
- Patterson SL (2014) Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1beta, BDNF and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*.
- Paxinos G, Franklin KBJ (2004) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Academic Press.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (Press, A., ed).
- Pekny M, Wilhelmsson U, Bogestal YR, Pekna M (2007) The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. *International review of neurobiology* 82:95-111.
- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21:6706-6717.
- Penkowa M, Tio L, Giralt M, Quintana A, Molinero A, Atrian S, Vasak M, Hidalgo J (2006) Specificity and divergence in the neurobiologic effects of different metallothioneins after brain injury. *J Neurosci Res* 83:974-984.
- Pepper MS (1997) Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17:605-619.
- Perry VH, Bell MD, Brown HC, Matyszak MK (1995) Inflammation in the nervous system. *Current opinion in neurobiology* 5:636-641.
- Petersen MA, Dailey ME (2004) Diverse microglial motility behaviors during clearance of dead cells in hippocampal slices. *Glia* 46:195-206.
- Petreanu L, Alvarez-Buylla A (2002) Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 22:6106-6113.
- Piao CS, Stoica BA, Wu J, Sabirzhanov B, Zhao Z, Cabatbat R, Loane DJ, Faden AI (2013) Late exercise reduces neuroinflammation and cognitive dysfunction after traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 54:252-263.
- Picard-Riera N, Decker L, Delarasse C, Goude K, Nait-Oumesmar B, Liblau R, Pham-Dinh D, Baron-Van Evercooren A (2002) Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13211-13216.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
- Plesnila N, Friedrich D, Eriskat J, Baethmann A, Stoffel M (2003) Relative cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical lesion in rats. *Neurosci Lett* 345:85-88.

- Politis M, Lindvall O (2012) Clinical application of stem cell therapy in Parkinson's disease. *BMC medicine* 10:1.
- Price TO, Eranki V, Banks WA, Ercal N, Shah GN (2012) Topiramate treatment protects blood-brain barrier pericytes from hyperglycemia-induced oxidative damage in diabetic mice. *Endocrinology* 153:362-372.
- Prieto R, Gutiérrez-Gonzalez JM, Roda JM, Cerdán S, Matias-Guiu J, Barcia JA (2009) Modelos experimentales de traumatismo craneoencefálico. *Neurocirugía* 20:225-244.
- Priller J, Flugel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernandez-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U (2001) Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 7:1356-1361.
- Prins ML, Hovda DA (2003) Developing experimental models to address traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma* 20:123-137.
- Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-74.
- Quintana A, Giralt M, Molinero A, Campbell IL, Penkowa M, Hidalgo J (2007) Analysis of the cerebral transcriptome in mice subjected to traumatic brain injury: importance of IL-6. *Neuroimmunomodulation* 14:139-143.
- Rabinovic AD, Hastings TG (1998) Role of endogenous glutathione in the oxidation of dopamine. *J Neurochem* 71:2071-2078.
- Ragaisis V (2002) [Brain contusion: morphology, pathogenesis and treatment]. *Medicina* 38:243-249; quiz 354.
- Rakic P (1985) Limits of neurogenesis in primates. *Science* 227:1054-1056.
- Ramachandran S, Croft P, Neary RH (2003) A prospective study in primary care in patients without vascular disease comparing levels of coronary risk factors in those recommended for lipid-lowering drugs based on either absolute risk or absolute risk reduction. *Preventive cardiology* 6:17-21.
- Ramsden DB, Parsons RB, Ho SL, Waring RH (2001) The etiology of idiopathic Parkinson's disease. *Mol Pathol* 54:369-380.
- Ransohoff RM, Perry VH (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual review of immunology* 27:119-145.
- Raps SP, Lai JC, Hertz L, Cooper AJ (1989) Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. *Brain Res* 493:398-401.
- Raslan F, Albert-Weissenberger C, Ernestus RI, Kleinschnitz C, Siren AL (2012) Focal brain trauma in the cryogenic lesion model in mice. *Exp Transl Stroke Med* 4:6.
- Readnower RD, Chavko M, Adeeb S, Conroy MD, Pauly JR, McCarron RM, Sullivan PG (2010) Increase in blood-brain barrier permeability, oxidative stress, and activated microglia in a rat model of blast-induced traumatic brain injury. *J Neurosci Res* 88:3530-3539.
- Reed DJ (1986) Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem Pharmacol* 35:7-13.
- Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW (1980) High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal Biochem* 106:55-62.
- Reed LJ (2001) A trail of research from lipoic acid to alpha-keto acid dehydrogenase complexes. *J Biol Chem* 276:38329-38336.
- Retel J, Hoebee B, Braun JE, Lutgerink JT, van den Akker E, Wanamarta AH, Joenje H, Lafleur MV (1993) Mutational specificity of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 299:165-182.
- Reulen HJ, Tsuyumu M, Tack A, Fenske AR, Prioleau GR (1978) Clearance of edema fluid into cerebrospinal fluid. A mechanism for resolution of vasogenic brain edema. *J Neurosurg* 48:754-764.
- Richard MJ, Guiraud P, Meo J, Favier A (1992) High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *Journal of chromatography* 577:9-18.
- Richardson RM, Sun D, Bullock MR (2007) Neurogenesis after traumatic brain injury. *Neurosurg Clin N Am* 18:169-181, xi.
- Riedel W, Lang U, Oetjen U, Schlapp U, Shibata M (2003) Inhibition of oxygen radical formation by methylene blue, aspirin, or alpha-lipoic acid, prevents bacterial-lipopolysaccharide-induced fever. *Molecular and cellular biochemistry* 247:83-94.

- Risau W, Flamme I (1995) Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:73-91.
- Roberts I, Schierhout G, Alderson P (1998) Absence of evidence for the effectiveness of five interventions routinely used in the intensive care management of severe head injury: a systematic review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65:729-733.
- Rocamonde B, Paradells S, Barcia C, Garcia Esparza A, Soria JM (2013) Lipoic acid treatment after brain injury: study of the glial reaction. *Clinical & developmental immunology* 2013:521939.
- Rocamonde B, Paradells S, Barcia JM, Barcia C, Garcia Verdugo JM, Miranda M, Romero Gomez FJ, Soria JM (2012) Neuroprotection of lipoic acid treatment promotes angiogenesis and reduces the glial scar formation after brain injury. *Neuroscience* 224:102-115.
- Roitbak T, Li L, Cunningham LA (2008) Neural stem/progenitor cells promote endothelial cell morphogenesis and protect endothelial cells against ischemia via HIF-1 α -regulated VEGF signaling. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1530-1542.
- Rosell-Novel A, Montaner JÁ-S, J. (2004) Implicación de la angiogénesis en la isquemia cerebral humana. *Rev Neurol* 38:1076-1082.
- Rosenthal N (2003) Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *N Engl J Med* 349:267-274.
- Ross D (1998) Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. *Pharmacol Ther* 37:231-249.
- Ross MH, Pawlina W (2012) *Histología. Texto y atlas color con Biología Celular y Molecular*. Editorial Médica Panamericana.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- Roy NS, Wang S, Jiang L, Kang J, Benraiss A, Harrison-Restelli C, Fraser RA, Couldwell WT, Kawaguchi A, Okano H, Nedergaard M, Goldman SA (2000) In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med* 6:271-277.
- Roy S, Packer L (1998) Redox regulation of cell functions by alpha-lipoate: biochemical and molecular aspects. *BioFactors* 8:17-21.
- Roy S, Sen CK, Tritschler HJ, Packer L (1997) Modulation of cellular reducing equivalent homeostasis by alpha-lipoic acid. Mechanisms and implications for diabetes and ischemic injury. *Biochem Pharmacol* 53:393-399.
- Ruiter DJ, van der Meulen J, Brouwer A, Hummel MJ, Mauw BJ, van der Ploeg JC, Wisse E (1981) Uptake by liver cells of endotoxin following its intravenous injection. *Lab Invest* 45:38-45.
- Ryu JK, Davalos D, Akassoglou K (2009) Fibrinogen signal transduction in the nervous system. *J Thromb Haemost* 7 Suppl 1:151-154.
- Saito A, Maier CM, Narasimhan P, Nishi T, Song YS, Yu F, Liu J, Lee YS, Nito C, Kamada H, Dodd RL, Hsieh LB, Hassid B, Kim EE, Gonzalez M, Chan PH (2005) Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia. *Mol Neurobiol* 31:105-116.
- Salinthon S, Yadav V, Bourdette DN, Carr DW (2008) Lipoic acid: a novel therapeutic approach for multiple sclerosis and other chronic inflammatory diseases of the CNS. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 8:132-142.
- Samantaray S, Knaryan VH, Guyton MK, Matzelle DD, Ray SK, Banik NL (2007) The parkinsonian neurotoxin rotenone activates calpain and caspase-3 leading to motoneuron degeneration in spinal cord of Lewis rats. *Neuroscience* 146:741-755.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164:247-256.
- Sanchez J, Bianchi MS, Ciancio VR, Bolzan AD (2008) Analysis of spontaneous and streptonigrin-induced sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of aircrew members of international flights. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 27:277-285.
- Sandhya P, Mohandass S, Varalakshmi P (1995) Role of DL alpha-lipoic acid in gentamicin induced nephrotoxicity. *Molecular and cellular biochemistry* 145:11-17.

- Sanz MM, Johnson LE, Ahuja S, Ekstrom PA, Romero J, van Veen T (2007) Significant photoreceptor rescue by treatment with a combination of antioxidants in an animal model for retinal degeneration. *Neuroscience* 145:1120-1129.
- Sargin D, Hassouna I, Sperling S, Siren AL, Ehrenreich H (2009) Uncoupling of neurodegeneration and gliosis in a murine model of juvenile cortical lesion. *Glia* 57:693-702.
- Satriano JA, Shuldiner M, Hora K, Xing Y, Shan Z, Schlondorff D (1993) Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. *J Clin Invest* 92:1564-1571.
- Sauerbeck A, Gao J, Readnower R, Liu M, Pauly JR, Bing G, Sullivan PG (2011) Pioglitazone attenuates mitochondrial dysfunction, cognitive impairment, cortical tissue loss, and inflammation following traumatic brain injury. *Exp Neurol* 227:128-135.
- Savitz SI, Fisher M (2007) Future of neuroprotection for acute stroke: in the aftermath of the SAINT trials. *Ann Neurol* 61:396-402.
- Sawada M, Sawamoto K (2013) Mechanisms of neurogenesis in the normal and injured adult brain. *The Keio journal of medicine* 62:13-28.
- Schabitz WR, Schwab S, Spranger M, Hacke W (1997) Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:500-506.
- Schmidt CE, Leach JB (2003) Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annual review of biomedical engineering* 5:293-347.
- Schonheit K, Gille L, Nohl H (1995) Effect of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid on ischemia/reperfusion injury of the heart and heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1271:335-342.
- Schreibelt G, Musters RJ, Reijkerk A, de Groot LR, van der Pol SM, Hendriks EM, Dopp ED, Dijkstra CD, Drukarch B, de Vries HE (2006) Lipoic acid affects cellular migration into the central nervous system and stabilizes blood-brain barrier integrity. *J Immunol* 177:2630-2637.
- Schubert D, Piasecki D (2001) Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. *J Neurosci* 21:7455-7462.
- Schwab JM, Beschorner R, Nguyen TD, Meyermann R, Schluesener HJ (2001) Differential cellular accumulation of connective tissue growth factor defines a subset of reactive astrocytes, invading fibroblasts, and endothelial cells following central nervous system injury in rats and humans. *J Neurotrauma* 18:377-388.
- Schwamborn J, Lindecke A, Elvers M, Horejschi V, Kerick M, Rafigh M, Pfeiffer J, Prullage M, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (2003) Microarray analysis of tumor necrosis factor alpha induced gene expression in U373 human glioblastoma cells. *BMC Genomics* 4:46.
- Selassie AW, Zaloshnja E, Langlois JA, Miller T, Jones PJ, Steiner C (2003) Incidence of long-term disability following traumatic brain injury hospitalization, United States. *J Head Trauma Rehabil* 23:123-131
- Shaked I, Porat Z, Gersner R, Kipnis J, Schwartz M (2004) Early activation of microglia as antigen-presenting cells correlates with T cell-mediated protection and repair of the injured central nervous system. *J Neuroimmunol* 146:84-93.
- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13726-13731.
- Shao C, Roberts KN, Markesbery WR, Scheff SW, Lovell MA (2006) Oxidative stress in head trauma in aging. *Free Radic Biol Med* 41:77-85.
- Sharma A, Gokulchandran N, Chopra G, Kulkarni P, Lohia M, Badhe P, Jacob VC (2012) Administration of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in children with incurable neurological disorders and injury is safe and improves their quality of life. *Cell Transplant* 21 Suppl 1:S79-90.
- Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP (2005) Curcumin: the story so far. *European journal of cancer* 41:1955-1968.
- Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM (2009) Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 1790:1149-1160.

- Shen LH, Li Y, Chen J, Cui Y, Zhang C, Kapke A, Lu M, Savant-Bhonsale S, Chopp M (2007a) One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke. *Stroke* 38:2150-2156.
- Shen LH, Li Y, Chen J, Zacharek A, Gao Q, Kapke A, Lu M, Raginski K, Vanguri P, Smith A, Chopp M (2007b) Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:6-13.
- Shen LH, Ye M, Ding XS, Han Q, Zhang C, Liu XF, Huang H, Wu EB, Huang HF, Gu XS (2012) Protective effects of MCI-186 on transplantation of bone marrow stromal cells in rat ischemic stroke model. *Neuroscience* 223:315-324.
- Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S (2008) Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3:289-300.
- Shimizu F, Sano Y, Maeda T, Abe MA, Nakayama H, Takahashi R, Ueda M, Ohtsuki S, Terasaki T, Obinata M, Kanda T (2008) Peripheral nerve pericytes originating from the blood-nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. *J Cell Physiol* 217:388-399.
- Shoichet MS, Tate CC, Baumann MD, LaPlaca MC (2008) Strategies for Regeneration and Repair in the Injured Central Nervous System Environment.
- Shukla A, Shukla R, Dikshit M, Srimal RC (1993) Alterations in free radical scavenging mechanisms following blood-brain barrier disruption. *Free Radic Biol Med* 15:97-100.
- Siegel G, Schafer R, Dazzi F (2009) The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation* 87:S45-49.
- Sies H (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 91:31S-38S.
- Silverthorn DDU (2008) *Fisiología Humana. Un enfoque integrado: Editorial Medica Panamericana.*
- Simard M, Nedergaard M (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129:877-896.
- Sims NR, Nilsson M, Muyderman H (2004) Mitochondrial glutathione: a modulator of brain cell death. *J Bioenerg Biomembr* 36:329-333.
- Sindhu RK, Ehdai A, Farmand F, Dhaliwal KK, Nguyen T, Zhan CD, Roberts CK, Vaziri ND (2005) Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. *Biochim Biophys Acta* 1743:86-92.
- Siren AL, Radyushkin K, Boretius S, Kammer D, Riechers CC, Natt O, Sargin D, Watanabe T, Sperling S, Michaelis T, Price J, Meyer B, Frahm J, Ehrenreich H (2006) Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin. *Brain* 129:480-489.
- Skibska B, Jozefowicz-Okonkwo G, Goraca A (2006) Protective effects of early administration of alpha-lipoic acid against lipopolysaccharide-induced plasma lipid peroxidation. *Pharmacol Rep* 58:399-404.
- Slepneva IA, Sergeeva SV, Khramtsov VV (1995) Reversible inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase by alpha-lipoic acid. *Biochemical and biophysical research communications* 214:1246-1253.
- Slevin M, Kumar P, Gaffney J, Kumar S, Krupinski J (2006) Can angiogenesis be exploited to improve stroke outcome? Mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)* 111:171-183.
- Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh JH, Hagen TM (2004) Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem* 11:1135-1146.
- Smith BA, Xie BW, van Beek ER, Que I, Blankevoort V, Xiao S, Cole EL, Hoehn M, Kaijzel EL, Lowik CW, Smith BD (2012) Multicolor fluorescence imaging of traumatic brain injury in a cryolesion mouse model. *ACS Chem Neurosci* 3:530-537.
- Snell RS (2007) *Neuroanatomía clínica. Buenos Aires: Médica Panamericana.*
- Snyder EY, Teng YD (2012) Stem cells and spinal cord repair. *N Engl J Med* 366:1940-1942.
- Song B, Song J, Zhang S, Anderson MA, Ao Y, Yang CY, Deming TJ, Sofroniew MV (2012) Sustained local delivery of bioactive nerve growth factor in the central nervous system via tunable diblock copolypeptide hydrogel depots. *Biomaterials* 33:9105-9116.
- Song J, Cheon SY, Jung W, Lee WT, Lee JE (2014) Resveratrol induces the expression of interleukin-10 and brain-derived neurotrophic factor in BV2 microglia under hypoxia. *Int J Mol Sci* 15:15512-15529.

- Song JH, Wang CX, Song DK, Wang P, Shuaib A, Hao C (2005) Interferon gamma induces neurite outgrowth by up-regulation of p35 neuron-specific cyclin-dependent kinase 5 activator via activation of ERK1/2 pathway. *J Biol Chem* 280:12896-12901.
- Soria JM, Martinez Ramos C, Bahamonde O, Garcia Cruz DM, Salmeron Sanchez M, Garcia Esparza MA, Casas C, Guzman M, Navarro X, Gomez Ribelles JL, Garcia Verdugo JM, Monleon Pradas M, Barcia JA (2007) Influence of the substrate's hydrophilicity on the in vitro Schwann cells viability. *J Biomed Mater Res A* 83:463-470.
- Soria JM, Martinez Ramos C, Salmeron Sanchez M, Benavent V, Campillo Fernandez A, Gomez Ribelles JL, Garcia Verdugo JM, Pradas MM, Barcia JA (2006) Survival and differentiation of embryonic neural explants on different biomaterials. *J Biomed Mater Res A* 79:495-502.
- Stephan AH, Barres BA, Stevens B (2012) The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu Rev Neurosci* 35:369-389.
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SW, Barres BA (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131:1164-1178.
- Stokes AH, Hastings TG, Vrana KE (1999) Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res* 55:659-665.
- Sugaya K, Chou S, Xu SJ, McKinney M (1998) Indicators of glial activation and brain oxidative stress after intraventricular infusion of endotoxin. *Brain Res Mol Brain Res* 58:1-9.
- Sullivan PG, Keller JN, Mattson MP, Scheff SW (1998) Traumatic brain injury alters synaptic homeostasis: implications for impaired mitochondrial and transport function. *J Neurotrauma* 15:789-798.
- Sun YD, Dong YD, Fan R, Zhai LL, Bai YL, Jia LH (2012) Effect of (R)-alpha-lipoic acid supplementation on serum lipids and antioxidative ability in patients with age-related macular degeneration. *Annals of nutrition & metabolism* 60:293-297.
- Suri C, Fung BP, Tischler AS, Chikaraishi DM (1993) Catecholaminergic cell lines from the brain and adrenal glands of tyrosine hydroxylase-SV40 T antigen transgenic mice. *J Neurosci* 13:1280-1291.
- Svensk AM, Soini Y, Paakko P, Hiravikoski P, Kinnula VL (2004) Differential expression of superoxide dismutases in lung cancer. *American journal of clinical pathology* 122:395-404.
- Szelag M, Mikulski D, Molski M (2012) Quantum-chemical investigation of the structure and the antioxidant properties of alpha-lipoic acid and its metabolites. *Journal of molecular modeling* 18:2907-2916.
- Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J (2006) A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien)* 148:255-268; discussion 268.
- Tate CC, Case CC (eds.) (2012a) Mesenchymal stromal cells to treat brain injury, advanced topics in neurological disorders.
- Tate CC, Case CC (2012b) Mesenchymal stromal cells to treat brain injury, advanced topics in neurological disorders. Mountain View, CA: SanBio, Inc.
- Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM, Doetsch F (2008) A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3:279-288.
- Taylor SE, Morganti-Kossmann C, Lifshitz J, Ziebell JM (2014) Rod microglia: a morphological definition. *PLoS One* 9:e97096.
- Teichert J, Kern J, Tritschler HJ, Ulrich H, Preiss R (1998) Investigations on the pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther* 36:625-628.
- Telfer JF, Brock JH (2004) Proinflammatory cytokines increase iron uptake into human monocytes and synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 10:BR91-95.
- Temple S (2001) The development of neural stem cells. *Nature* 414:112-117.
- Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Leker RR (2012) Combination of vascular endothelial and fibroblast growth factor 2 for induction of neurogenesis and angiogenesis after traumatic brain injury. *J Mol Neurosci* 47:166-172.

- Thored P, Wood J, Arvidsson A, Cammenga J, Kokaia Z, Lindvall O (2007) Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* 38:3032-3039.
- Thurman DJ, Alverson C, Dunn KA, Guerrero J, Sniezek JE (1999) Traumatic brain injury in the United States: A public health perspective. *J Head Trauma Rehabil* 14:602-615.
- Tikka TM, Koistinaho JE (2001) Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* 166:7527-7533.
- Tobinick E, Kim NM, Reyzin G, Rodriguez-Romanacce H, DePuy V (2012) Selective TNF inhibition for chronic stroke and traumatic brain injury: an observational study involving 629 consecutive patients treated with perispinal etanercept. *CNS drugs* 26:1051-1070.
- Todd MM, Weeks JB, Warner DS (1993) A focal cryogenic brain lesion does not reduce the minimum alveolar concentration for halothane in rats. *Anesthesiology* 79:139-143.
- Toklu HZ, Hakan T, Biber N, Solakoglu S, Ogunc AV, Sener G (2009) The protective effect of alpha lipoic acid against traumatic brain injury in rats. *Free Radic Res* 43:658-667.
- Tokuda M, Hatase O (1998) Regulation of neuronal plasticity in the central nervous system by phosphorylation and dephosphorylation. *Mol Neurobiol* 17:137-156.
- Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD (2001) Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3:778-784.
- Tomassoni D, Amenta F, Amantini C, Farfariello V, Di Cesare Mannelli L, Nwankwo IE, Marini C, Tayebati SK (2013) Brain activity of thioctic Acid enantiomers: in vitro and in vivo studies in an animal model of cerebrovascular injury. *Int J Mol Sci* 14:4580-4595.
- Torrente Y, Polli E (2008) Mesenchymal stem cell transplantation for neurodegenerative diseases. *Cell Transplant* 17:1103-1113.
- Touyz RM (2004) Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44:248-252.
- Touzani O, Roussel S, MacKenzie ET (2001) The ischaemic penumbra. *Curr Opin Neurol* 14:83-88.
- Trotta PP, Platzter KE, Haschemeyer RH, Meister A (1974) Glutamine-binding subunit of glutamate synthase and partial reactions catalyzed by this glutamine amidotransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:4607-4611.
- Trush MA, Mimnaugh EG, Gram TE (1982) Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmacol* 31:3335-3346.
- Tsacopoulos M, Magistretti PJ (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16:877-885.
- Tsai EC, Dalton PD, Shoichet MS, Tator CH (2004) Synthetic hydrogel guidance channels facilitate regeneration of adult rat brainstem motor axons after complete spinal cord transection. *J Neurotrauma* 21:789-804.
- Turu MM, Slevin M, Matou S, West D, Rodriguez C, Luque A, Grau-Olivares M, Badimon L, Martinez-Gonzalez J, Krupinski J (2008) C-reactive protein exerts angiogenic effects on vascular endothelial cells and modulates associated signalling pathways and gene expression. *BMC Cell Biol* 9:47.
- Tuttolomondo A, Pecoraro R, Pinto A (2014) Studies of selective TNF inhibitors in the treatment of brain injury from stroke and trauma: a review of the evidence to date. *Drug design, development and therapy* 8:2221-2238.
- Tweedie D, Sambamurti K, Greig NH (2007) TNF-alpha inhibition as a treatment strategy for neurodegenerative disorders: new drug candidates and targets. *Current Alzheimer research* 4:378-385.
- Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL (2004) Edema and brain trauma. *Neuroscience* 129:1021-1029.
- Urrea C, Castellanos DA, Sagen J, Tsoulfas P, Bramlett HM, Dietrich WD (2007) Widespread cellular proliferation and focal neurogenesis after traumatic brain injury in the rat. *Restor Neurol Neurosci* 25:65-76.
- Valverde F (2002) [Structure of the cerebral cortex. Intrinsic organization and comparative analysis of the neocortex]. *Rev Neurol* 34:758-780.
- Vannucci RC, Perlman JM (1997) Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 100:1004-1014.

- Vaquero J, Zurita M (2011) Functional recovery after severe CNS trauma: current perspectives for cell therapy with bone marrow stromal cells. *Prog Neurobiol* 93:341-349.
- Veiga DD, Antunes JC, Gomez RG, Mano JF, Ribelles JL, Soria JM (2011) Three-dimensional scaffolds as a model system for neural and endothelial 'in vitro' culture. *J Biomater Appl* 26:293-310.
- Vescovi AL, Gritti A, Galli R, Parati EA (1999) Isolation and intracerebral grafting of nontransformed multipotential embryonic human CNS stem cells. *J Neurotrauma* 16:689-693.
- Victor VV, Guayerbas N, Puerto M, Medina S, De la Fuente M (2000) Ascorbic acid modulates in vitro the function of macrophages from mice with endotoxic shock. *Immunopharmacology* 46:89-101.
- Vilar-Rojas C, Guzman-Grenfell AM, Hicks JJ (1996) Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins. *Arch Med Res* 27:1-6.
- Villapol S, Byrnes KR, Symes AJ (2014) Temporal dynamics of cerebral blood flow, cortical damage, apoptosis, astrocyte-vasculature interaction and astrogliosis in the pericontusional region after traumatic brain injury. *Front Neurol* 5:82.
- von Zahn J, Moller T, Kettenmann H, Nolte C (1997) Microglial phagocytosis is modulated by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Neuroreport* 8:3851-3856.
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007) The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 184:53-68.
- Wang XF, Cynader MS (2001) Pyruvate released by astrocytes protects neurons from copper-catalyzed cysteine neurotoxicity. *J Neurosci* 21:3322-3331.
- Wanner IB, Anderson MA, Song B, Levine J, Fernandez A, Gray-Thompson Z, Ao Y, Sofroniew MV (2013) Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J Neurosci* 33:12870-12886.
- Watanabe T, Sagisaka H, Arakawa S, Shibaya Y, Watanabe M, Igarashi I, Tanaka K, Totsuka S, Takasaki W, Manabe S (2003) A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-buthionine (S,R)-sulfoximine. *J Toxicol Sci* 28:455-469.
- Weissman IL, Anderson DJ, Gage F (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:387-403.
- Welsch U (2008) *Histología/ Sobotta*.
- Werner C, Engelhard K (2007) Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth* 99:4-9.
- Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC (2009) Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 108:1343-1359.
- Wiche G, Oberkanins C, Himmler A (1991) Molecular structure and function of microtubule-associated proteins. *Int Rev Cytol* 124:217-273.
- Widera D, Holtkamp W, Entschladen F, Niggemann B, Zanker K, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (2004) MCP-1 induces migration of adult neural stem cells. *Eur J Cell Biol* 83:381-387.
- Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V, Terada M, Ellisman MH, Pekny M (2006) Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17513-17518.
- Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE (2007) Approaches to neural tissue engineering using scaffolds for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 59:325-338.
- Williams AJ, Hartings JA, Lu XC, Rolli ML, Dave JR, Tortella FC (2005) Characterization of a new rat model of penetrating ballistic brain injury. *J Neurotrauma* 22:313-331.
- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG (2002) Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 16:1681-1689.
- Winyard P, Morris C, Winrow V, Ziaidi M, Blake D (1994) Free radical pathways in the inflammatory response. *Elsevier Science* 361-383.
- Wollin SD, Jones PJ (2003) Alpha-lipoic acid and cardiovascular disease. *J Nutr* 133:3327-3330.
- Wong AD, Ye M, Levy AF, Rothstein JD, Bergles DE, Searson PC (2013) The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng* 6:7.

- Wong G, Goldshmit Y, Turnley AM (2004) Interferon-gamma but not TNF alpha promotes neuronal differentiation and neurite outgrowth of murine adult neural stem cells. *Exp Neurol* 187:171-177.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61:364-370.
- Wu D (2005) Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2:120-128.
- Wu H, Lu D, Jiang H, Xiong Y, Qu C, Li B, Mahmood A, Zhou D, Chopp M (2008) Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 25:130-139.
- Wu W, Chen X, Hu C, Li J, Yu Z, Cai W (2010) Transplantation of neural stem cells expressing hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) improves behavioral recovery in a rat stroke model. *J Clin Neurosci* 17:92-95.
- Wullner U, Loschmann PA, Schulz JB, Schmid A, Dringen R, Eblen F, Turski L, Klockgether T (1996) Glutathione depletion potentiates MPTP and MPP+ toxicity in nigral dopaminergic neurones. *Neuroreport* 7:921-923.
- Xiong Y, Lu D, Qu C, Goussev A, Schallert T, Mahmood A, Chopp M (2008) Effects of erythropoietin on reducing brain damage and improving functional outcome after traumatic brain injury in mice. *J Neurosurg* 109:510-521.
- Xiong Y, Zhang Y, Mahmood A, Meng Y, Zhang ZG, Morris DC, Chopp M (2012) Neuroprotective and neurorestorative effects of thymosin beta4 treatment initiated 6 hours after traumatic brain injury in rats. *J Neurosurg* 116:1081-1092.
- Xue T, Cho HC, Akar FG, Tsang SY, Jones SP, Marban E, Tomaselli GF, Li RA (2005) Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers. *Circulation* 111:11-20.
- Yamada T, Hashida K, Takarada-lemata M, Matsugo S, Hori O (2011) alpha-Lipoic acid (LA) enantiomers protect SH-SY5Y cells against glutathione depletion. *Neurochem Int* 59:1003-1009.
- Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P, Garcia-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H, Sawamoto K (2006) Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 26:6627-6636.
- Yang CY, Song B, Ao Y, Nowak AP, Abelowitz RB, Korsak RA, Havton LA, Deming TJ, Sofroniew MV (2009) Biocompatibility of amphiphilic diblock copolyptide hydrogels in the central nervous system. *Biomaterials* 30:2881-2898.
- Yang M, Wei X, Li J, Heine LA, Rosenwasser R, Iacovitti L (2010a) Changes in host blood factors and brain glia accompanying the functional recovery after systemic administration of bone marrow stem cells in ischemic stroke rats. *Cell Transplant* 19:1073-1084.
- Yang WZ, Zhang Y, Wu F, Min WP, Minev B, Zhang M, Luo XL, Ramos F, Ichim TE, Riordan NH, Hu X (2010b) Safety evaluation of allogeneic umbilical cord blood mononuclear cell therapy for degenerative conditions. *Journal of translational medicine* 8:75.
- Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J (2001) Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 38:1395-1399.
- Zhang H, Uchimura K, Kadomatsu K (2006) Brain keratan sulfate and glial scar formation. *Ann N Y Acad Sci* 1086:81-90.
- Zhang J, Li Y, Chen J, Yang M, Katakowski M, Lu M, Chopp M (2004) Expression of insulin-like growth factor 1 and receptor in ischemic rats treated with human marrow stromal cells. *Brain Res* 1030:19-27.
- Zhang J, Shi XQ, Echeverry S, Mogil JS, De Koninck Y, Rivest S (2007a) Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. *J Neurosci* 27:12396-12406.
- Zhang QG, Laird MD, Han D, Nguyen K, Scott E, Dong Y, Dhandapani KM, Brann DW (2012) Critical role of NADPH oxidase in neuronal oxidative damage and microglia activation following traumatic brain injury. *PLoS One* 7:e34504.

- Zhang R, Zhang L, Zhang Z, Wang Y, Lu M, Lapointe M, Chopp M (2001) A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. *Ann Neurol* 50:602-611.
- Zhang S, Anderson MA, Ao Y, Khakh BS, Fan J, Deming TJ, Sofroniew MV (2014) Tunable diblock copolypeptide hydrogel depots for local delivery of hydrophobic molecules in healthy and injured central nervous system. *Biomaterials* 35:1989-2000.
- Zhang WJ, Wei H, Hagen T, Frei B (2007b) Alpha-lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4077-4082.
- Zhang XM, Du F, Yang D, Yu CJ, Huang XN, Liu W, Fu J (2010) Transplanted bone marrow stem cells relocate to infarct penumbra and co-express endogenous proliferative and immature neuronal markers in a mouse model of ischemic cerebral stroke. *BMC neuroscience* 11:138.
- Zhang Y, Barres BA (2010) Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Current opinion in neurobiology* 20:588-594.
- Zhang ZG, Chopp M (2009) Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. *Lancet Neurol* 8:491-500.
- Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M (2002) Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circulation research* 90:284-288.
- Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132:645-660.
- Zhao J, Shi J, Shao K, Wang Y, Meng A, Zeng X, Chen N (2015a) [Regulation of transplantation of human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells on secretion of neural biochemistry marker after traumatic brain injury in rats]. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi = Journal of biomedical engineering = Shengwu yixue gongchengxue zazhi* 32:152-156.
- Zhao L, Hu FX (2014) alpha-Lipoic acid treatment of aged type 2 diabetes mellitus complicated with acute cerebral infarction. *European review for medical and pharmacological sciences* 18:3715-3719.
- Zhao L, Wang C, Song D, Li Y, Song Y, Su G, Dunaief JL (2014) Systemic administration of the antioxidant/iron chelator alpha-lipoic acid protects against light-induced photoreceptor degeneration in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55:5979-5988.
- Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC (2002) Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 174:11-20.
- Zhao Y, Xiao M, He W, Cai Z (2015b) Minocycline upregulates cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus of cerebral ischemia rats and improves behavioral deficits. *Neuropsychiatric disease and treatment* 11:507-516.
- Zhu C, Xiong Z, Chen X, Peng F, Hu X, Chen Y, Wang Q (2012) Artemisinin attenuates lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory responses by inhibiting NF-kappaB pathway in microglia cells. *PLoS One* 7:e35125.
- Ziegler D, Hanefeld M, Ruhnau KJ, Hasche H, Lobisch M, Schutte K, Kerum G, Malessa R (1999a) Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a 7-month multicenter randomized controlled trial (ALADIN III Study). *ALADIN III Study Group. Alpha-Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy. Diabetes care* 22:1296-1301.
- Ziegler D, Hanefeld M, Ruhnau KJ, Meissner HP, Lobisch M, Schutte K, Gries FA (1995) Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the anti-oxidant alpha-lipoic acid. A 3-week multicentre randomized controlled trial (ALADIN Study). *Diabetologia* 38:1425-1433.
- Ziegler D, Reljanovic M, Mehnert H, Gries FA (1999b) Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy in Germany: current evidence from clinical trials. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107:421-430.
- Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, Davisson RL (2002) Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circulation research* 91:1038-1045.
- Zohar O, Schreiber S, Getslev V, Schwartz JP, Mullins PG, Pick CG (2003) Closed-head minimal traumatic brain injury produces long-term cognitive deficits in mice. *Neuroscience* 118:949-955.

Zurita M, Vaquero J (2006) Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: functional and morphological outcome one year after transplantation. Neurosci Lett 402:51-56.

ANEXO I

NEUROPROTECTION OF LIPOIC ACID TREATMENT PROMOTES ANGIOGENESIS AND REDUCES THE GLIAL SCAR FORMATION AFTER BRAIN INJURY

B. ROCAMONDE,^a S. PARADELLS,^a J. M. BARCIA,^c C. BARCIA,^d J. M. GARCÍA VERDUGO,^e M. MIRANDA,^a F. J. ROMERO GÓMEZ^{c,f} AND J. M. SORIA^{a,b,*}

^a *Facultad Ciencias de la Salud, Universidad CEU-Cardenal Herrera, Moncada, Valencia, Spain*

^b *Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad CEU-Cardenal Herrera, Moncada, Valencia, Spain*

^c *Facultad de Medicina, Universidad Católica San Vicente Mártir, Valencia, Spain*

^d *Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Spain*

^e *Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universidad de Valencia, Spain*

^f *Fundación Oftalmológica del Mediterráneo, Valencia, Spain*

Abstract—After trauma brain injury, a large number of cells die, releasing neurotoxic chemicals into the extracellular medium, decreasing cellular glutathione levels and increasing reactive oxygen species that affect cell survival and provoke an enlargement of the initial lesion. Alpha-lipoic acid is a potent antioxidant commonly used as a treatment of many degenerative diseases such as multiple sclerosis or diabetic neuropathy. Herein, the antioxidant effects of lipoic acid treatment after brain cryo-injury in rat have been studied, as well as cell survival, proliferation in the injured area, gliogenesis and angiogenesis. Thus, it is shown that newborn cells, mostly corresponded with blood vessels and glial cells, colonized the damaged area 15 days after the lesion. However, lipoic acid was able to stimulate the synthesis of glutathione, decrease cell death, promote angiogenesis and decrease the glial scar formation. All those facts allow the formation of new neural tissue. In view of the results herein, lipoic acid might be a plausible pharmacological treatment after brain injury, acting as a neuroprotective agent of the neural tissue, promoting angiogenesis and reducing the glial scar formation. These findings open new possibilities for restorative strategies after brain injury, stroke or related disorders. © 2012 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Correspondence to: J. M. Soria, Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad CEU-Cardenal Herrera, Avenida del Seminario s/n, Moncada 46313, Valencia, Spain. Tel: +34-96-136-90-00x1353; fax: +34-96-139-52-72. E-mail address: jose.soria@uch.ceu.es (J. M. Soria).

Abbreviations: BBB, blood–brain barrier; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BrdU, bromodeoxyuridine; CC, cystic cavity; DZ, damaged zone; FBS, foetal bovine serum; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GS, glial scar; IZ, intact zone; LA, lipoic acid; LV, lateral ventricle; PBS, phosphate buffer saline; PFA, paraformaldehyde; ROS, reactive oxygen species; RZ, regeneration zone; SVZ, subventricular zone; TBI, trauma brain injury; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labelling; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Key words: antioxidant, lipoic acid, neuroprotection, angiogenesis, brain injury, glial scar.

INTRODUCTION

Traumatic brain injury (TBI) is the leading cause of death and disability worldwide (Maegerle and Schaefer, 2008). A significant number of patients with TBI survive with significant brain damage and behavioural impairment, even after mild or moderate head injury (Jennett, 1972; Harrahill, 1997). Brain cryo-injury model is placed in an intermediate position within the hierarchy of models of brain injury (Klementiev et al., 2008) between the craniotomy model (Pierce et al., 1998; Hannay et al., 1999; Laurer and McIntosh, 1999; Royle et al., 1999; Williams et al., 2005) and minor head injury model (Tang et al., 1997; Zohar et al., 2003; Henninger et al., 2005). This model requires a cryo-lesion minimally invasive surgery and maintains the state of asepsis, but produces severe changes in brain morphology and cognitive and motor disorders (Jones et al., 2005; Penkowa et al., 2006).

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

Glutathione is the most abundant non-protein thiol found in the brain. The reduced glutathione form (GSH) serves as a substrate for the enzymatic reduction of

peroxides via glutathione peroxidase being transformed to its oxidized form. The relevance of the oxidative imbalance after TBI or other neuropathologies seems to be closely related to the BBB integrity and infiltrative processes. In this sense, cellular permeability impairment seems to be secondary to oxidative stress (Gursoy-Ozdemir et al., 2004; Parathath et al., 2006). Some studies have been targeting on the oxidative imbalance and antioxidant therapies in experimental models of stroke or TBI revealing interesting findings. The administration of S-nitrosoglutathione, a potent antioxidant originated from GSH and nitric oxide (Rauhala et al., 1998) restored BBB disruption after TBI (Khan et al., 2009).

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

On the other hand, it is well known that TBI promotes neovascularization processes and increases levels of the vascular endothelial growth factor (VEGF) (Morgan et al., 2007). Furthermore, it has been shown how VEGF administration after TBI promotes neurogenesis (Thau-Zuchman et al., 2010). Although little is known about the effects of the antioxidants on the neovascularization processes after TBI, some data on ischaemia–reperfusion models have been reported. The administration of resveratrol, a natural stilbene present in grapes, improved the TBI outcome probably by regulating VEGF and nitric oxide synthase (Tsai et al., 2007; Dong et al., 2008) whereas it reduced the metalloprotease-9 levels and decreased oxidative stress values (Sinha et al., 2002; Gao et al., 2006).

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

To summarize, three important facts are implicated in the evolution of the injured area after TBI, leading to cell death or survival: (i) neovascularization, (ii) redox milieu,

and (iii) glial reactivity. Therefore, these three facts are important targets to address new pharmacological strategies with clinical interest for the positive outcome of neural diseases, brain traumatic injuries and stroke.

In the present work, we suggest LA as a suitable strategy for neuroprotection and neovascularization processes, after TBI. In this sense, LA restored GSH levels after a brain injury, reduced apoptosis and glial reactivity, increased proliferation and stimulated angiogenesis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Experimental animal models

Adult male Wistar rats (Harlan, Italy) weighing 250 ± 25 g were housed (two rats per box) 1 week before starting the experiment. Rats were housed in controlled conditions of temperature (20 °C) and humidity (60%), under constant light–dark cycles of 12 h. Handling and care of animals were done according the *Real Decreto* 1201/05 and supervised and approved by the Committee of Ethics and Experimental Procedures of the Universidad CEU-Cardenal Herrera. Unnecessary stress or pain was avoided as far as possible.

Surgery and brain cryo-injury. Rats were anesthetized with a mixture consisting of ketamine (12 mg/kg), acepromizine (0.4 mg/kg) and fentanyl (0.02 mg/kg) that was injected i.p. and then placed in a stereotaxic frame. The dorsal part of the skull was exposed and a hole was drilled on stereotaxic coordinates (Paxinos and Watson, 1986) antero-posterior: 0 mm from bregma and lateral: 1.5 mm from medial line (Fig. 1). The brain cryo-injury was performed following the protocol described by Quintana et al. (2007). Thus, the cryo-injury (1 mm deep) was performed in the cerebral cortex by using a 28 G stainless steel probe previously frozen in liquid nitrogen. Finally, animals were sutured with a skin stapler (6.9 × 3.6 mm staples) and were i.p. administered a dose of a mixture of buprenorphine (0.015 mg/kg) and metamizol (20 mg/kg) was administered after surgery.

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

Experimental groups and LA administration. Cryo-injured rats were randomly selected immediately after surgery. One group ($n = 22$) received daily LA 100 mg/kg i.p. (Sigma Aldrich, Spain) for 7 days (CR + LA) starting the same day of surgery and the other group ($n = 22$) received the same volume of saline (NaCl 0.9% i.p.) for the same period of time (CR). Non-

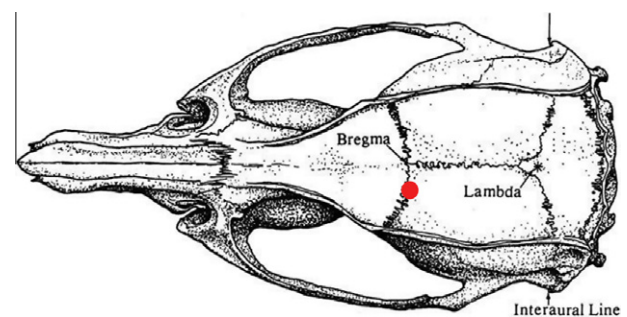


Fig. 1. Panoramic view of a rat skull (Paxinos and Watson, 1986). Red point indicates the coordinates where the cryo-injury was done. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

cryo-injured rats were divided in the same way: one group ($n = 18$) received a daily dose of LA as described previously (LA) and the other group ($n = 18$) received the same volume of saline (control).

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

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

Sacrifice and tissue preparation

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

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

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

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

Histological staining

Haematoxylin–eosin staining was performed for histological detection of the injured area by using brain sections from LA-treated (CR + LA) and non-treated animals (CR).

Cytological study

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

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

Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labelling (TUNEL). In order to evaluate cell death, TUNEL technique was performed by a standard *in situ* cell death detection kit (Roche Diagnostics, Spain). Sections were covered in darkness with DAPI Vectashield (Vector Laboratories) and observed with a Nikon fluorescence microscope.

Immunocytochemical procedures. Sections were washed three times with PBS 0.01 M for 5 min at room temperature, blocked for 2 h with 20% FBS in PBS–Triton 0.1% and incubated at 4 °C overnight with primary antibodies against: Collagen IV (1:200, Abcam, UK); glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:500, Dako Cytomation, Denmark), BrdU (1:200, Sigma Aldrich).

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

Biochemical procedures

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

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

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

Biochemical study by electrophoresis and Western blotting

Brain homogenates were made with a lysis buffer supplemented with dithiothreitol (DTT) 1 mM, NaF 10 mM, Complete 1X and Na_2VO_4 1 mM, and centrifuged at 14,000 rpm for 20 min and the supernatant was collected. Electrophoresis was performed at 200 V for 75 min.

Western blot was performed for Collagen Type IV- $\alpha 2$ (COL4A2) (1:500, Santa Cruz, USA); VEGF (1:500, Santa Cruz) and BDNF (1:500, Santa Cruz). Goat F(ab) polyclonal IgG – H&L (HRP) (1:5000, Santa Cruz) was used as secondary antibody. The reaction was revealed by ECL-Plus detection system (Ameshan Biotech) and was analysed with ImageQuant LAS 4000.

Quantification and statistical analysis

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

In order to do the quantification of the cytological study, four sections of each animal group ($n = 6$) were selected. Immunocytochemical images were quantified with Image J 1.44i for Mac. The evaluation of the cell density (n° cells/ mm^2) was quantified in the first 500 μm from the injury limit. The number of cells was determinate by the nuclei presence and referred to the total area quantified. The percentage of area occupied by astrocytes and blood vessels was calculated as the area occupied by the corresponding marker referred to total area quantified.

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

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

RESULTS

Histological and ultra-structural characterization of the injured area

In order to characterize the morphology of the cortical brain injury, a haematoxylin–eosin staining was performed. The cryo-injury was done satisfactorily as shown in coronal section (Fig. 2A) and transverse section (Fig. 2B). The brain-injured area was located close to the lateral ventricle (LV) (Fig. 2C) and a higher magnification

(Fig. 2D) showed the histological appearance of the lesion. In LA non-treated animals, exists a cystic cavity (CC) completely defined, delimited by a scar (arrows in Fig. 2E). In opposition, in LA-treated animals (Fig. 2F), the CC is not well defined because of the presence of neural tissue (arrow heads in Fig. 2F) grown inside the CC from the edge of the lesion (arrows in Fig. 2F).

When the area adjacent to the lesion is examined, we observed obvious differences in the evolution of the neural tissue after 15 days comparing non-treated and LA-treated group. An image of a semithin section of a non-treated animal showed three delimited zones (Fig. 3A). First zone is close to the CC, formed by a glial scar (GS). Following this zone there is a damaged zone (DZ) characterized by a lot of intercellular spaces, dying cell and some microglial cells. And the third is the intact zone (IZ), composed by neural tissue that has not suffered any change because of the injury. Close to the CC we observed the GS with more details in ME images (Fig. 3B), and we are able to discriminate a large number of intermediate filaments of these astroglial cells that form the GS (asterisks in Fig. 3C).

On the other hand, LA-treated animal (CR + LA) presented a few differences in the three zones (Fig. 4A). In the first zone there does not exist a glial scar, instead there is a regeneration zone (RZ). The tissue has grown to invade the CC, is an area of remodelling. The following two zones are the same as in the non-treated animals: a DZ and an IZ. Images taken by ME showed the presence of blood vessels, glial cells and some axons in the RZ (Fig. 4B), the DZ (Fig. 4C) and the IZ (Fig. 4D). In Fig. 4E is shown a great deal of intercellular spaces (blue colour) in the RZ, which decrease in the DZ (Fig. 4F) and finally, in the IZ, the intact tissue has no intercellular spaces (Fig. 4G).

Effect of LA on cell survival

The TUNEL technique was used in order to analyse the effect of LA on cell survival 15 days after brain injury. Test assay was performed onto brain tissue sections of LA non-treated animals (CR) and LA-treated animals (CR + LA) in the first 500 μm from the CC, showing a statistically significant decrease ($p < 0.05$) of the density of dead cells (n° cells/ mm^2) (Fig. 5A) in animals treated with LA compared with non-treated.

Antioxidant capacity and the presence of neurotrophic factors in the injured area after LA treatment

Antioxidant capacity and GSH levels were measured after 7 days of LA treatment (Fig. 6). The injured brain homogenate samples of the cryo-injured and LA non-treated group (Fig. 6A) presented lower antioxidant capacity than control animals ($p < 0.001$). However, when cryo-injured animals were treated with LA (CR + LA) the antioxidant capacity increased significantly ($p < 0.01$), compared with the non-treated group. The Fig. 6B (Fig. 6B) shows that GSH levels in control animals were higher than in the injured and

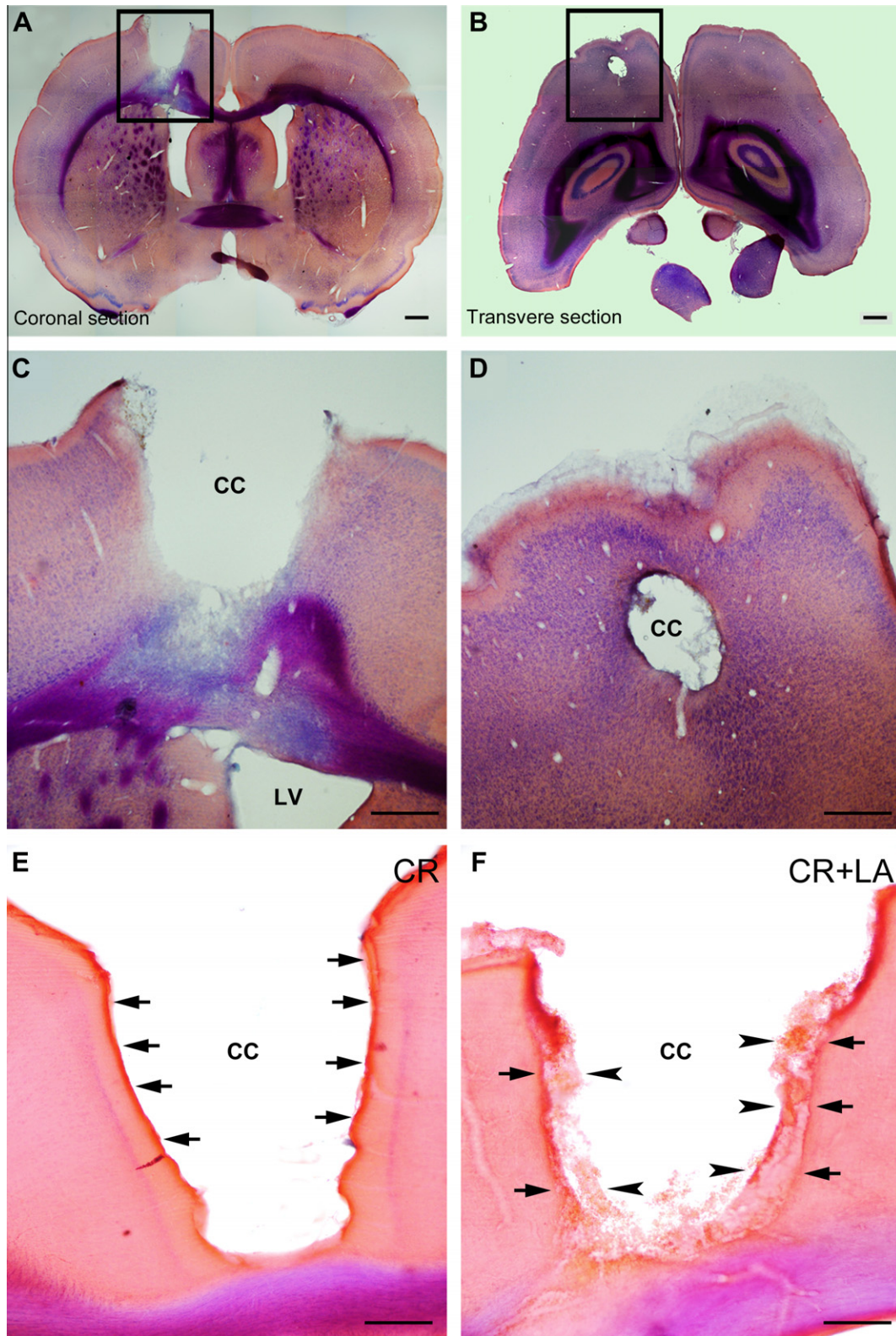


Fig. 2. Haematoxylin–eosin staining of the cortical brain injury localized close to the lateral ventricle (LV) in a coronal section (A) and transverse section (B). A detail of the injury in coronal section (C) and transverse section (D). And the histological appearance the cystic cavity (CC) of the injury in a non-treated animal (CR) (E) and LA-treated animal (CR + LA) (F). Arrows indicate the limit of the injury and arrowheads indicate the new neural tissue. Scale bar = 500 μ m in A–D; 250 μ m in E, F.

non-treated group and lower than in animals injured and treated with LA (CR + LA) although not statistically

significant. Moreover, glutathione concentration was increased ($p < 0.01$) in injured animals treated with LA

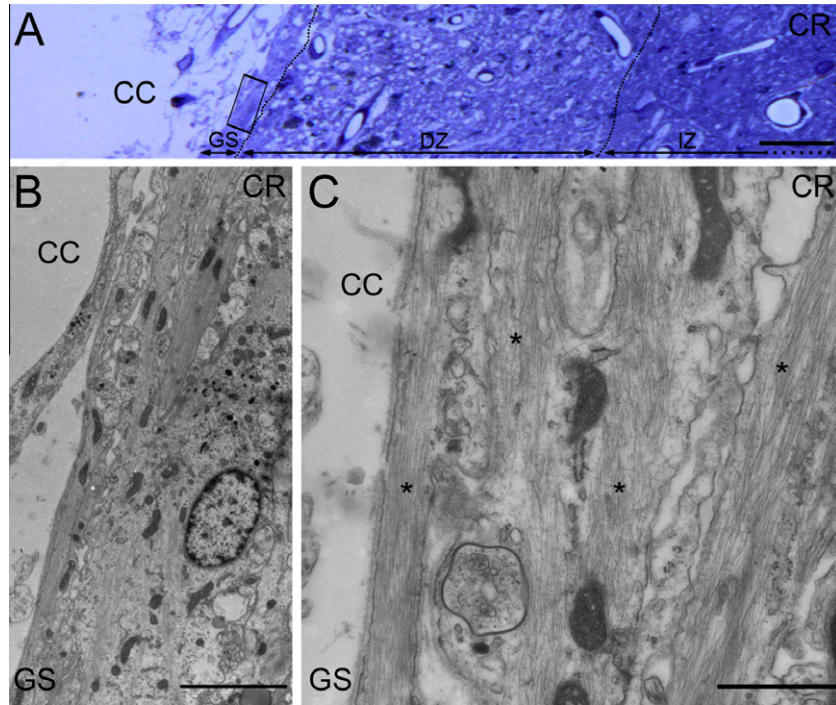


Fig. 3. Image of a semithin-stained section (A) of a non-treated animal (CR). The pointed lines delimit three principal zones. First zone close to the cystic cavity (CC) is the glial scar (GS); second zone is the damaged zone (DZ) and third is the intact zone (IZ). Image of electron microscopy of the GS (B) and a detail of the glial cells in the GS (C). Scale bar = 50 μm in A; 5 μm in B and 1 μm in C.

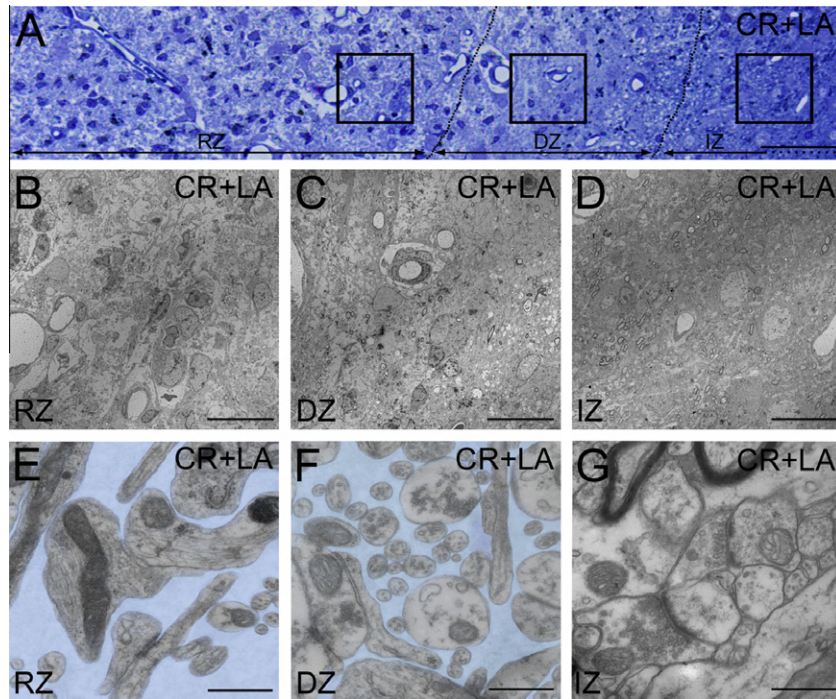


Fig. 4. Image of a semithin-stained section (A) of a LA-treated animal (CR + LA). The pointed lines delimit three zones. First zone is the regeneration zone (RZ), second zone is the damaged zone (DZ) and third zone is the intact zone (IZ). Image of electron microscopy of the RZ (B, E), DZ (C, F) and IZ (D, G). The blue colour in E and F indicates the intercellular spaces. Scale bar = 50 μm in A; 20 μm in B, C, D; 600 nm in E–G. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(CR + LA) compared with injured animals non-treated with LA (CR).

On the other hand, the quantification of the Western blots after 15 days (Fig. 7A), showed a statistically

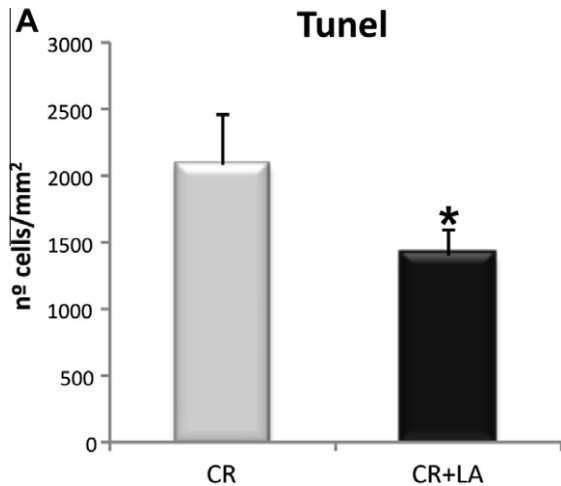


Fig. 5. Measurement of TUNEL-positive cells in the injured area after 15 days. * $p < 0.05$.

significant increase ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) of both pCREB (Fig. 7B) and BDNF (Fig. 7C) proteins in the LA-treated group (CR + LA) compared with the non-treated group (CR).

Proliferation and differentiation events after LA treatment

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

Close to the cortical brain injured area, BrdU-labelled cells differentiated to different cell types after 15 days.

Thus co-labelling studies by immunohistochemistry against glial cells (GFAP) and blood vessels (Collagen IV) showed that the majority of BrdU⁺ cells co-labelled with GFAP⁺ (Fig. 9A) and Collagen IV⁺ (Fig. 9B) cells in animals treated with LA for 7 days.

Glial reactivity after LA treatment

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

Angiogenesis after LA treatment

The presence of blood vessels was evaluated performing immunohistochemistry for Collagen IV. In animals non-treated with LA, blood vessels appeared with a random distribution along the injured area (Fig. 11A). In contrast, the distribution of blood vessels in LA-treated animals (CR + LA) was apparently with a parallel distribution and in the direction of the lesion (Fig. 11B). The quantification of the area occupied by blood vessels

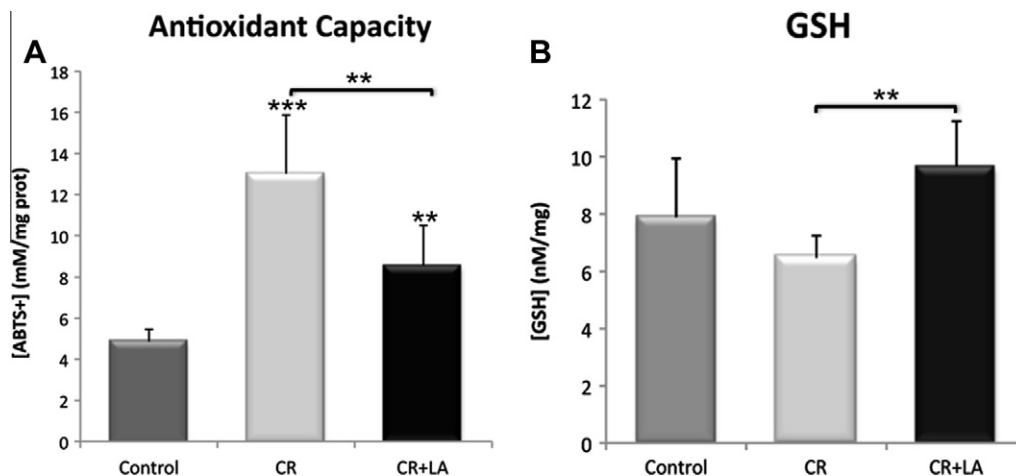


Fig. 6. Measure of the antioxidant capacity after 7 days of brain-homogenated samples by ELISA (left). Glutathione measurement by HPLC of homogenated brain tissue of each group of animals (right). Control: animals without lesion and treatment; CR: lesion brain of LA non-treated animals; CR + LA: lesion brain of LA-treated animals. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

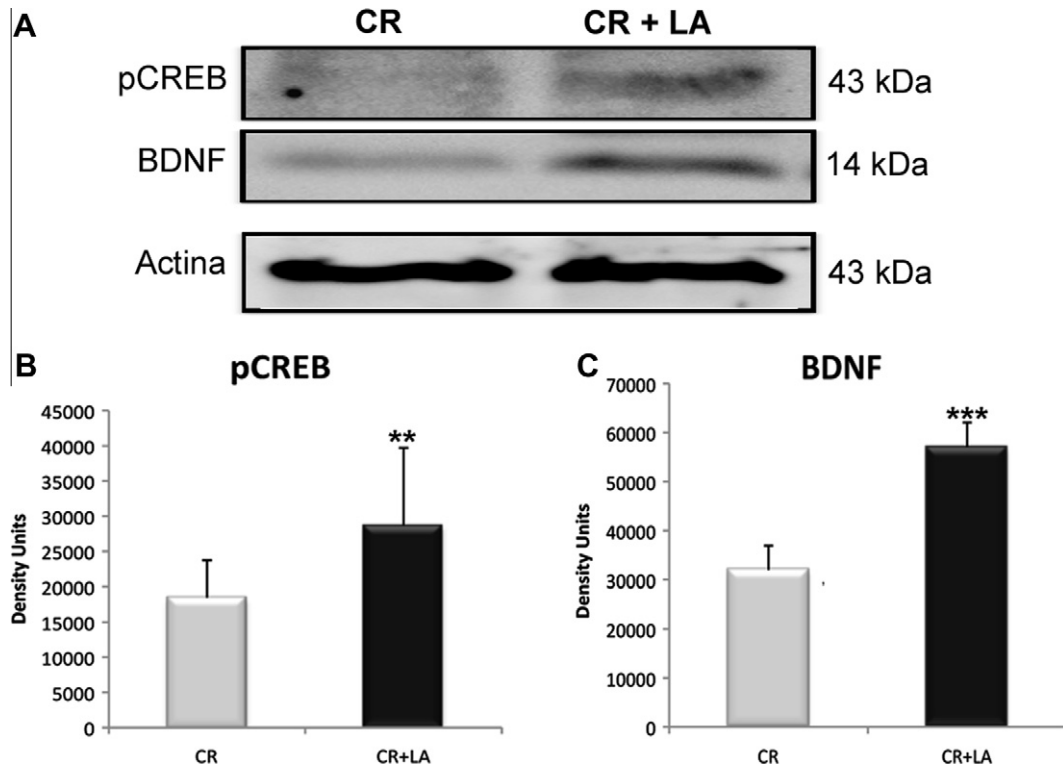


Fig. 7. Image of the band detection for pCREB (left) and BDNF (right) proteins for non-treated animals (CR) and treated animals (CR + LA). Quantification of the band density of pCREB protein (B) and BDNF protein (C). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

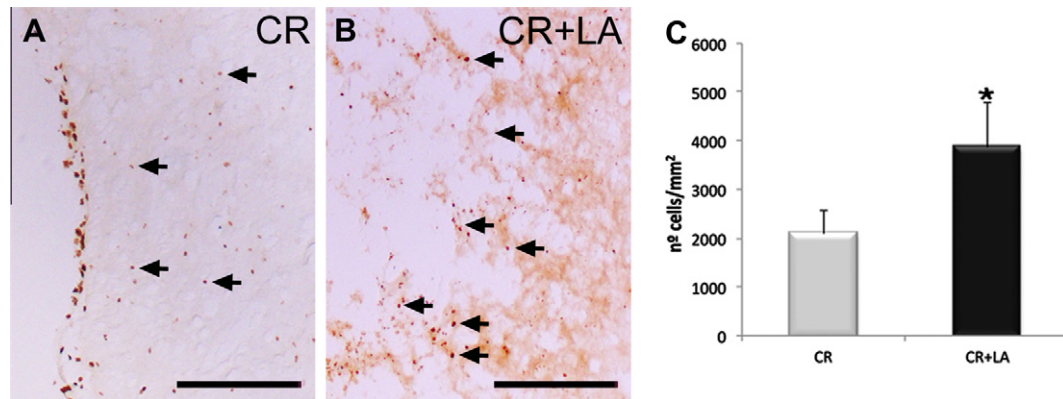


Fig. 8. Immunohistochemistry for BrdU in injured area of non-treated animals (A) and LA-treated animals (B). Arrows indicate BrdU-positive cells. Scale bar = 500 μ m. Quantification of the density of BrdU-positive cells (n° cells/mm²) in the injured area (C). * $p < 0.05$.

(Fig. 11C) showed a statistically significant increase ($p < 0.05$) of this area in LA-treated group (CR + LA) compared with non-treated (CR).

We have already observed that LA promotes new blood vessels formation after a brain injury compared with non-treated animals. In order to understand the molecular mechanism of the blood vessels formation, we administered bevacizumab (Avastin) that blocks VEGF. Immunohistochemistry for Collagen IV in non-treated animals (Fig. 12A) showed a decrease in blood vessels formation when bevacizumab was administered, but not in LA-treated animals (Fig. 12B). Western blot for VEGF was done to corroborate the

effect of bevacizumab on VEGF and for collagen (COL4A2) (Fig. 12C). The quantification (Fig. 12D) showed that when bevacizumab was administered to the animals (CR + AV and CR + AV + LA) was observed a significant decrease in VEGF values and also a statistically significant decrease ($p < 0.001$) of collagen values compared to control group (CR and CR + LA, respectively), indicating that VEGF is, almost in part, responsible of the synthesis of collagen. However, collagen values were increased ($p < 0.001$) in LA-treated animals (CR + AV + LA) compared with non-treated animals (CR + AV), showing that LA is able to stimulate the synthesis of collagen by itself.

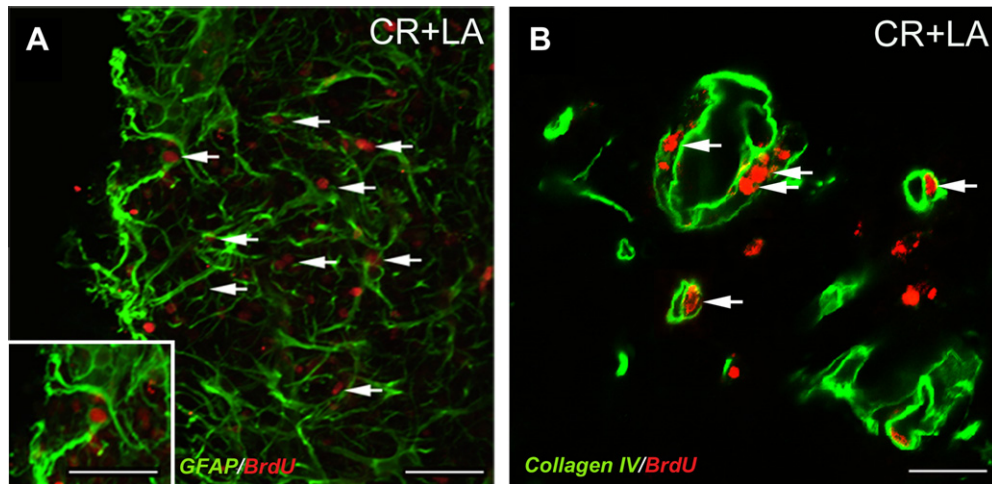


Fig. 9. Immunohistochemistry for BrdU (red) and GFAP (green) (A) and BrdU (red) and Collagen IV (green) (B) in LA-treated animals (CR + LA). Arrows indicate colabelling between two markers. Scale bar = 100 μm in A; 50 μm in B. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

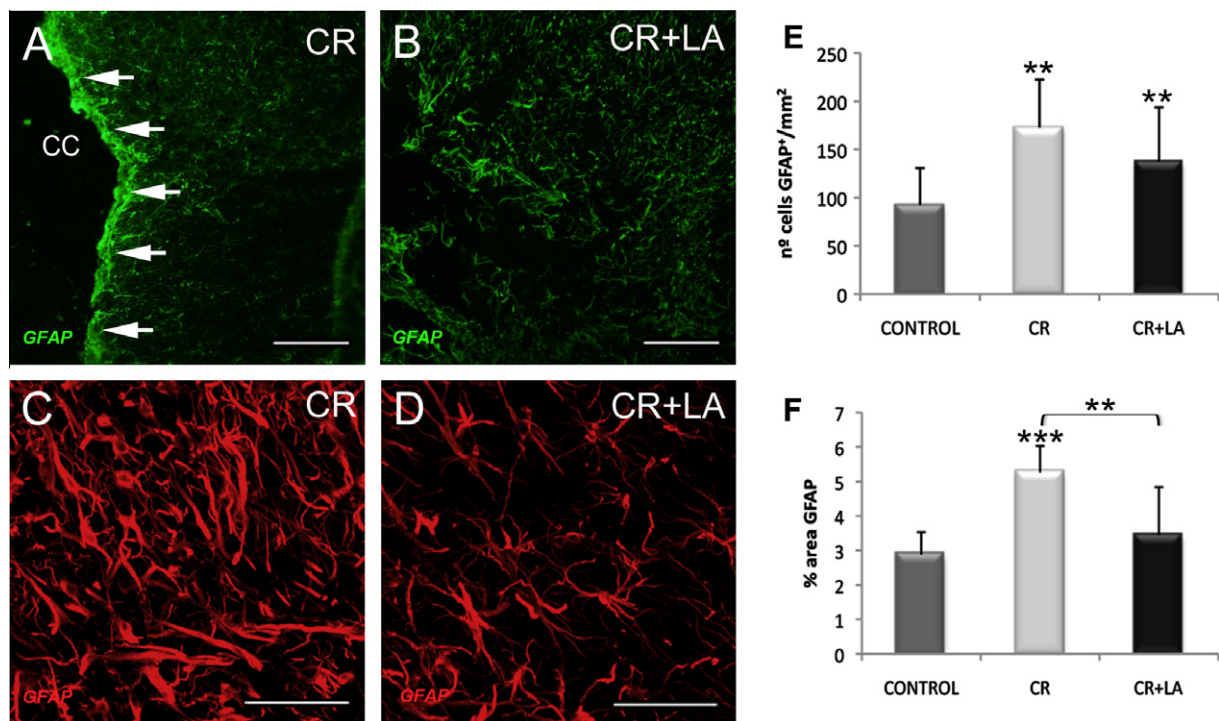


Fig. 10. Immunohistochemistry assay for GFAP in the injured area of non-treated animals (A) and LA-treated animals (B). Arrows indicate the glial scar formed in non-treated animals. Appearance of astrocytes in non-treated animals (C) and LA-treated animals (D). Scale bar = 200 μm in A, B; 200 μm in C,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

DISCUSSION

One of the first findings herein is the description of three zones around the injured area 15 days after the lesion. As described previously, there is a well-established GS followed by a, damaged zone (DZ) surrounding the CC. Finally, a third unaffected zone named as IZ as part of the neural parenchyma (Fig. 13A). LA treatment for 7 days after the lesion significantly diminished the GS

15 days after LA treatment. Instead, we observed a continuity of neural tissue named herein as RZ characterized by the presence of several blood vessels expanded through the RZ. This RZ expanded inside the CC and some glial cells and neurons with synaptic endings with large intercellular spaces were found filling the CC. This fact could be reasonably interpreted as a renewing process with cell death and proliferation (Fig. 13B).

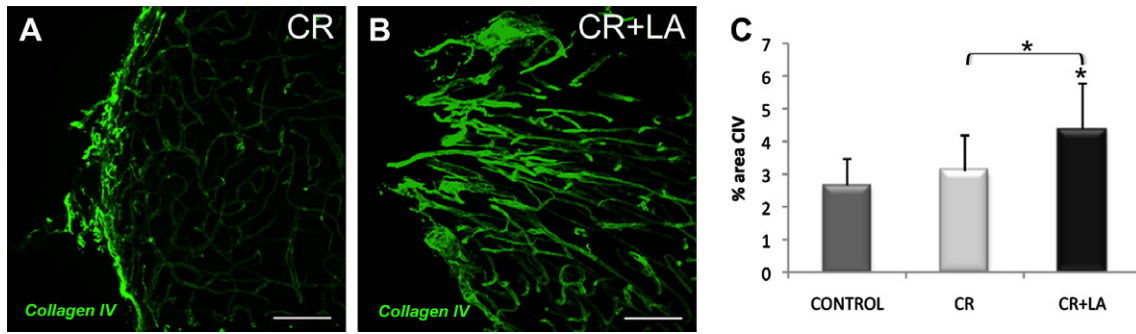


Fig. 11. Immunohistochemistry for Collagen IV in non-treated animal (A) and LA-treated animals (B). Scale bar = 200 μ m. Quantification of area occupied by blood vessels (% area CIV⁺). * p < 0.05.

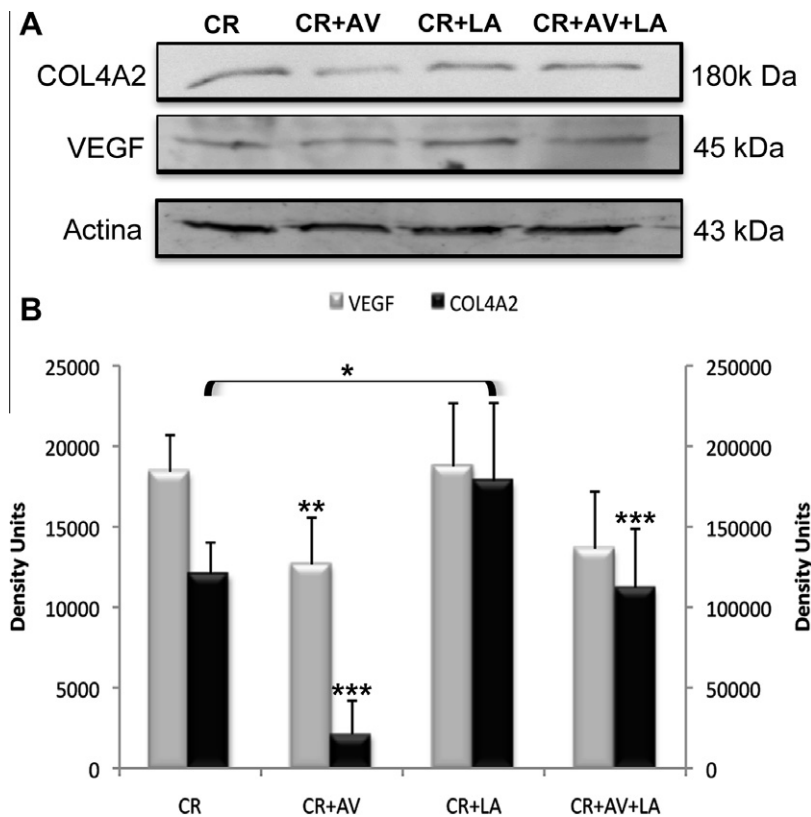


Fig. 12. Image of a Western blot for COL4A2 and VEGF proteins (A). Quantification in density units of COL42 and VEGF proteins for each experimental group (B). CR: non-treated animals; CR + AV: non-treated animals with Avastin; CR + LA: LA-treated animal; CR + AV + LA: LA-treated animals with Avastin. VEGF: CR versus CR + AV**. COL4A2: CR versus CR + AV***; CR versus CR + LA*; CR + AV versus CR + AV + LA***. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

On the other hand, it has been reported that, after a brain injury, a large number of cells die. Because of this death, many neurotoxic chemicals are released into the extracellular medium, promoting an increase of ROS and triggering more apoptotic/necrosis processes (Kaur and Ling, 2008) and decreasing GSH levels as a consequence of oxidative stress. Many studies have reported the antioxidants properties of LA after a brain trauma (Packer et al., 1997; Lynch, 2001) increasing GSH production (Packer et al., 1995) and the BBB recovery. In this study, an increase of the total antioxidant capacity was observed in the injured area

after 7 days of treatment, indicating that LA was able to cross the BBB (Shay et al., 2009) and to act as an antioxidant in the brain (Annahazi et al., 2007). Moreover, LA was able to recover GSH levels and also stimulate the synthesis of GSH *de novo*, which decreases ROS formation after brain injury (Packer et al., 1997; Toklu et al., 2009). It has been reported that a decrease in ROS promotes cell survival (Silva and Coutinho, 2010). Recent studies suggest that LA works as a good neuroprotector by acting as an antioxidant and anti-inflammatory agent (Freitas, 2009; Toklu et al., 2009), and is able to switch the regulation

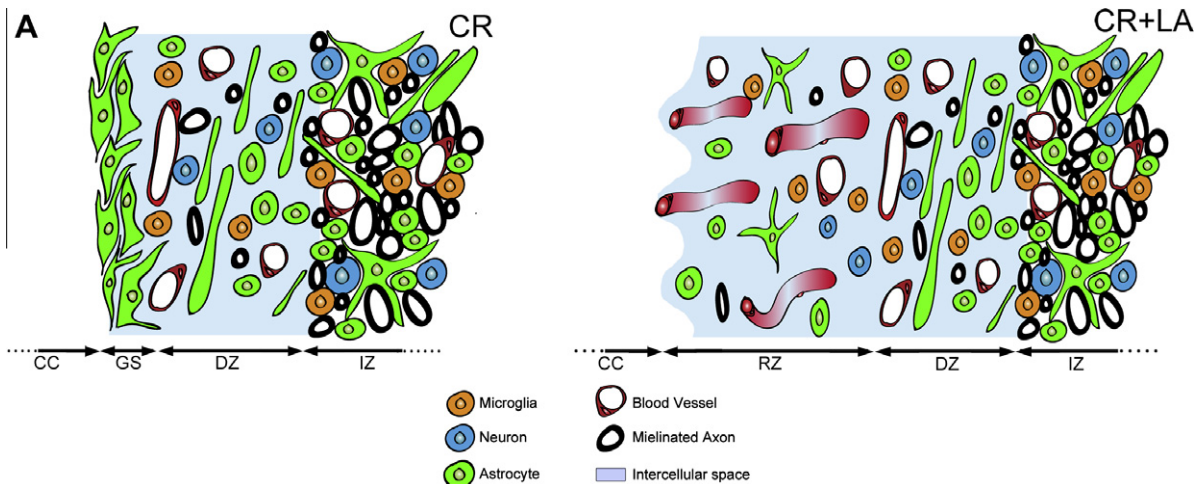


Fig. 13. Illustration representing both injured area of non-treated animals (A) and LA-treated animals (B). CC: cystic cavity; GS: glial scar; DZ: damaged zone; IZ: intact zone; RZ: regeneration zone.

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

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

Recently, some substances with antioxidant capacity such as resveratrol, a natural stilbene present in grapes, have been studied. Its administration has been reported to improve the TBI outcome probably by regulating VEGF and nitric oxide synthase (Tsai et al., 2007; Dong et al., 2008). It is also known that antioxidants, such as LA, help to reduce the permeability of the BBB and

therefore cell damage, while maintaining the ionic balance of Ca^{2+} and Mg^{2+} in brain endothelial cells (Li et al., 2000). In our study, it has been observed that LA is able to stimulate angiogenesis after brain injury. It has also been demonstrated that by blocking VEGF, LA is able to stimulate angiogenesis by itself.

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

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

Although LA administration is able to decrease the glial scar and promote the regeneration of neural tissue,

we do not know if these cells will be able to reconnect both sides of the injury.

CONCLUSIONS

Our data suggest that LA administered i.p. is able to cross the BBB acting as antioxidant in the brain tissue. When LA is administered for 7 days after brain cryo-injury, the antioxidant capacity of the damaged brain area increases as well as the GSH levels. This increase in GSH levels together with an increase of BDNF may promote cell survival and proliferation in the injury area after 15 days. On the other hand, we also observe an absence of glial scar and a reduction of the glial reactivity with LA treatment. Angiogenic processes have also been stimulated, occurring even when VEGF is blocked with bevancizumab. All this evidence could be responsible for the formation of new neural tissue beginning to invade the cystic cavity and open a window to another restorative strategy in brain injury.

Acknowledgements—J.M.S. acknowledges funding through Programa de Ayudas a la Investigación Científica Ramón Areces (2009) and funding through Copérnico-Santander (PRCEU-UCH/COP01/08) Universidad CEU-Cardenal Herrera and also Programa de Ayudas a la Investigación Universidad CEU-Cardenal Herrera (PRCEU-UCH16/09). F.J.R.G. acknowledges funding through Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 2010-21317). We thank Isidoro Olmeda, Teresa Catalán, Dra. Emma Arnal and Mayte Casado for technical support. We thank Rosa López and Dra. Inma Almansa for help in animal's care and availability for critical reading of this manuscript and Sergio del Rio for his help and support.

REFERENCES

- Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS (2000) Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20:2896–2903.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629–634.
- Annahazi A, Mracsko E, Sule Z, Karg E, Penke B, Bari F, Farkas E (2007) Pre-treatment and post-treatment with alpha-tocopherol attenuates hippocampal neuronal damage in experimental cerebral hypoperfusion. *Eur J Pharmacol* 571:120–128.
- Babu GN, Kumar A, Singh RL (2010) Chronic pretreatment with acetyl-L-carnitine and DL-alpha-lipoic acid protects against acute glutamate-induced neurotoxicity in rat brain by altering mitochondrial function. *Neurotox Res* 19:319–329.
- Barcia C, Sanderson NS, Barrett RJ, Wawrowsky K, Kroeger KM, Puntel M, Liu C, Castro MG, Lowenstein PR (2008) T cells' immunological synapses induce polarization of brain astrocytes in vivo and in vitro: a novel astrocyte response mechanism to cellular injury. *PLoS One* 3:2977–3005.
- Barrette B, Hebert MA, Filali M, Lafortune K, Vallieres N, Gowing G, Julien JP, Lacroix S (2008) Requirement of myeloid cells for axon regeneration. *J Neurosci* 28:9363–9376.
- Bessis A, Bechade C, Bernard D, Roumier A (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55:233–238.
- Binder DK, Scharfman HE (2004) Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22:123–131.
- Bushong EA, Martone ME, Ellisman MH (2004) Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci* 22:73–86.
- Chvatal A, Anderova M, Kirchhoff F (2007) Three-dimensional confocal morphometry – a new approach for studying dynamic changes in cell morphology in brain slices. *J Anat* 210:671–683.
- Demopoulos HB, Flamm ES, Pietronigro DD, Seligman ML (1980) The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand Suppl* 492:91–119.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391–397.
- Doetsch FG-VJ, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046–5052.
- Dong W, Li N, Gao D, Zhen H, Zhang X, Li F (2008) Resveratrol attenuates ischemic brain damage in the delayed phase after stroke and induces messenger RNA and protein expression for angiogenic factors. *J Vasc Surg* 48:709–714.
- Evans PH (1993) Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 49:577–587.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24:2143–2155.
- Freitas RM (2009) The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. *Neurosci Lett* 455:140–144.
- Gao D, Zhang X, Jiang X, Peng Y, Huang W, Cheng G, Song L (2006) Resveratrol reduces the elevated level of MMP-9 induced by cerebral ischemia–reperfusion in mice. *Life Sci* 78:2564–2570.
- Gennarelli G (1997) The pathobiology of traumatic brain injury. *Neuroscientist* 3:73–81.
- Gonzalez-Perez O, Gonzalez-Castaneda RE, Huerta M, Luquin S, Gomez-Pinedo U, Sanchez-Almaraz E, Navarro-Ruiz A, Garcia-Estrada J (2002) Beneficial effects of alpha-lipoic acid plus vitamin E on neurological deficit, reactive gliosis and neuronal remodeling in the penumbra of the ischemic rat brain. *Neurosci Lett* 321:100–104.
- Gursoy-Ozdemir Y, Can A, Dalkara T (2004) Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. *Stroke* 35:1449–1453.
- Hall ED, Braugher JM (1989) Central nervous system trauma and stroke. II. Physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 6:303–313.
- Hannay HJ, Feldman Z, Phan P, Keyani A, Panwar N, Goodman JC, Robertson CS (1999) Validation of a controlled cortical impact model of head injury in mice. *J Neurotrauma* 16:1103–1114.
- Harrahill M (1997) Management of severe head injury: new document provides guidelines. *Brain Trauma Found* 23:282–284.
- Helfaer MA, Kirsch JR, Traystman RJ (1994) Radical scavengers: penetration into brain following the ischemia and reperfusion. In: Kriegelstein J, Oberpichler-Schwenk H, editors. *Pharmacology of cerebral ischemia*. Medpharm Scientific. p. 297–309.
- Henninger N, Dutzmann S, Sicard KM, Kollmar R, Bardutzky J, Schwab S (2005) Impaired spatial learning in a novel rat model of mild cerebral concussion injury. *Exp Neurol* 195:447–457.
- Jennett B (1972) Prognosis after severe head injury. *Clin Neurosurg* 19:200–206.
- Jones NC, Prior MJ, Burden-Teh E, Marsden CA, Morris PG, Murphy S (2005) Antagonism of the interleukin-1 receptor following traumatic brain injury in the mouse reduces the number of nitric oxide synthase-2-positive cells and improves anatomical and functional outcomes. *Eur J Neurosci* 22:72–78.
- Kaur C, Ling EA (2008) Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system. *Curr Med Chem* 15:3068–3080.
- Khan M, Im YB, Shunmugavel A, Gilg AG, Dhindsa RK, Singh AK, Singh I (2009) Administration of S-nitrosoglutathione after traumatic brain injury protects the neurovascular unit and

- reduces secondary injury in a rat model of controlled cortical impact. *J Neuroinflamm* 6:32.
- Klementiev B, Novikova T, Korshunova I, Berezin V, Bock E (2008) The NCAM-derived P2 peptide facilitates recovery of cognitive and motor function and ameliorates neuropathology following traumatic brain injury. *Eur J Neurosci* 27:2885–2896.
- Kobold S, Hegewisch-Becker S, Oechsle K, Jordan K, Bokemeyer C, Atanackovic D (2009) Intraperitoneal VEGF inhibition using bevacizumab: a potential approach for the symptomatic treatment of malignant ascites? *Oncologist* 14:1242–1251.
- Kuhn HG, Palmer TD, Fuchs E (2001) Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251:152–158.
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH (1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17:5820–5829.
- Larghero P, Vene R, Minghelli S, Travaini G, Morini M, Ferrari N, Pfeffer U, Noonan DM, Albini A, Benelli R (2007) Biological assays and genomic analysis reveal lipoic acid modulation of endothelial cell behavior and gene expression. *Carcinogenesis* 28:1008–1020.
- Laurer HL, McIntosh TK (1999) Experimental models of brain trauma. *Curr Opin Neurol* 12:715–721.
- Lee J, Duan W, Mattson MP (2002) Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 82:1367–1375.
- Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI (2000) Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J Neurosci* 20:4615–4626.
- Li W, Zheng T, Altura BT, Altura BM (2000) Antioxidants prevent elevation in $[Ca^{2+}]_i$ induced by low extracellular magnesium in cultured canine cerebral vascular smooth muscle cells: possible relationship to Mg^{2+} deficiency-induced vasospasm and stroke. *Brain Res Bull* 52:151–154.
- Lipsky RH, Marini AM (2007) Brain-derived neurotrophic factor in neuronal survival and behavior-related plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 1122:130–143.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Lu X, Richardson PM (1991) Inflammation near the nerve cell body enhances axonal regeneration. *J Neurosci* 11:972–978.
- Lynch MA (2001) Lipoic acid confers protection against oxidative injury in non-neuronal and neuronal tissue. *Nutr Neurosci* 4:419–438.
- Maegele M, Schaefer U (2008) Stem cell-based cellular replacement strategies following traumatic brain injury (TBI). *Minim Invasive Therapy* 17:119–129.
- Mattson MP (2008) Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1144:97–112.
- Morgan R, Kreipke CW, Roberts G, Bagchi M, Rafols JA (2007) Neovascularization following traumatic brain injury: possible evidence for both angiogenesis and vasculogenesis. *Neuro Res* 29:375–381.
- Packer L, Tritschler HJ, Wessel K (1997) Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med* 22:359–378.
- Packer L, Witt EH, Tritschler HJ (1995) Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 19:227–250.
- Panigrahi M, Sadguna Y, Shivakumar BR, Kolluri SV, Roy S, Packer L, Ravindranath V (1996) Alpha-lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 717:184–188.
- Parathath SR, Parathath S, Tsirka SE (2006) Nitric oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood–brain barrier in tPA-dependent excitotoxic injury in mice. *J Cell Sci* 119:339–349.
- Paxinos G, Watson C (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press.
- Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB (2001a) Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp Neurol* 172:1–16.
- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001b) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21:6706–6717.
- Penkowa M, Tio L, Giralt M, Quintana A, Molinero A, Atrian S, Vasak M, Hidalgo J (2006) Specificity and divergence in the neurobiological effects of different metallothioneins after brain injury. *J Neurosci Res* 83:974–984.
- Pierce JE, Smith DH, Trojanowski JQ, McIntosh TK (1998) Enduring cognitive, neurobehavioral and histopathological changes persist for up to one year following severe experimental brain injury in rats. *Neuroscience* 87:359–369.
- Pulsinelli W (1992) Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet* 339:533–536.
- Quintana A, Giralt M, Molinero A, Campbell IL, Penkowa M, Hidalgo J (2007) Analysis of cerebral transcriptome in mice subjected to traumatic brain injury: importance of IL-6. *Neuromodulation* 40:139–143.
- Rauhala P, Lin AM, Chiueh CC (1998) Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. *FASEB J* 12:165–173.
- Reed DJ, Fariss MW (1984) Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol Rev* 36:25S–33S.
- Royle SJ, Collins FC, Rupniak HT, Barnes JC, Anderson R (1999) Behavioural analysis and susceptibility to CNS injury of four inbred strains of mice. *Brain Res* 816:337–349.
- Schabitz WR, Schwab S, Spranger M, Hacke W (1997) Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:500–506.
- Schabitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, Schneider A, Kuhn HG (2007) Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke* 38:2165–2172.
- Schreibelt G, Musters RJ, Reijerkerk A, de Groot LR, van der Pol SM, Hendriks EM, Dopp ED, Dijkstra CD, Drukarch B, de Vries HE (2006) Lipoic acid affects cellular migration into the central nervous system and stabilizes blood–brain barrier integrity. *J Immunol* 177:2630–2637.
- Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM (2009) Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 1790:1149–1160.
- Siesjo BK, Agardh CD, Bengtsson F (1989) Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1:165–211.
- Silva JP, Coulinho O (2010) Free radicals in regulation of damage and cell death: basic mechanisms and prevention. *Drugs Discov Ther* 4:144–166.
- Sinha K, Chaudhary G, Gupta YK (2002) Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci* 71:655–665.
- Tang YP, Noda Y, Hasegawa T, Nabeshima T (1997) A concussive-like brain injury model in mice (I): impairment in learning and memory. *J Neurotrauma* 14:851–862.
- Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Leker RR (2010) Vascular endothelial growth factor increases neurogenesis after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:1008–1016.
- Toklu HZ, Hakan T, Biber N, Solakoglu S, Ogunc AV, Sener G (2009) The protective effect of alpha lipoic acid against traumatic brain injury in rats. *Free Radic Res* 43:658–667.
- Tsai SK, Hung LM, Fu YT, Cheng H, Nien MW, Liu HY, Zhang FB, Huang SS (2007) Resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats. *J Vasc Surg* 46:346–353.
- Watson BD (1993) Evaluation of the concomitance of lipid peroxidation in experimental models of cerebral ischemia and stroke. *Prog Brain Res* 96:69–95.

- Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V, Terada M, Ellisman MH, Pekny M (2006) Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17513–17518.
- Williams AJ, Hartings JA, Lu XC, Rolli ML, Dave JR, Tortella FC (2005) Characterization of a new rat model of penetrating ballistic brain injury. *J Neurotrauma* 22:313–331.
- Wu D (2005) Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins. *NeuroRx* 2:120–128.
- Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P, Garcia-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H, Sawamoto K (2006) Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 26:6627–6636.
- Yukido I, Long MD (1990) The molecular basis of brain injury and brain edema. The role of oxygen free radicals. *Neurosurg* 27:1–9.
- Zohar O, Schreiber S, Getslev V, Schwartz JP, Mullins PG, Pick CG (2003) Closed-head minimal traumatic brain injury produces long-term cognitive deficits in mice. *Neuroscience* 118:949–955.

(Accepted 14 August 2012)
(Available online 20 August 2012)

ANEXO II

Research Article

Lipoic Acid Treatment after Brain Injury: Study of the Glial Reaction

Brenda Rocamonde,¹ Sara Paradells,¹ Carlos Barcia,²
Angeles Garcia Esparza,¹ and José Miguel Soria^{1,3}

¹ *Facultad Ciencias de la Salud, Universidad CEU Cardenal Herrera, Moncada, 46313 Valencia, Spain, Spain*

² *Institut de Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain*

³ *Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad CEU-Cardenal Herrera, Avenida del Seminario s/n, Moncada, 46313 Valencia, Spain*

Correspondence should be addressed to José Miguel Soria; jose.soria@uch.ceu.es

Received 26 April 2013; Revised 25 July 2013; Accepted 30 September 2013

Academic Editor: James Curtin

Copyright © 2013 Brenda Rocamonde et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

After trauma brain injury, oxidative substances released to the medium provoke an enlargement of the initial lesion, increasing glial cell activation and, occasionally, an influx of immune cells into the central nervous system, developing the secondary damage. In response to these stimuli, microglia are activated to perform upregulation of intracellular enzymes and cell surface markers to propagate the immune response and phagocytosis of cellular debris. The phagocytosis of debris and dead cells is essential to limit the inflammatory reaction and potentially prevent extension of the damage to noninjured regions. Lipoic acid has been reported as a neuroprotectant by acting as an antioxidant and anti-inflammatory agent. Furthermore, angiogenic effect promoted by lipoic acid has been recently shown by our group as a crucial process for neural regeneration after brain injury. In this work, we focus our attention on the lipoic acid effect on astroglial and microglial response after brain injury.

1. Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is a complex process involving a broad spectrum of symptoms and long-term consequences including disabilities [1]. As a consequence of the primary insult, many molecules from injured and dead cells induce microglial and astroglial activation [2] and disruption of the blood-brain barrier (BBB) [3]. In addition to the direct loss of tissue caused by the trauma, secondary mechanisms leading to additional tissue injury are important for outcome and therefore constitute important therapeutic targets [4].

Recently, interest has been focused on oxidative stress as a mechanism involved in the development of secondary brain damage [5]. After brain injury, a local increase in glial cell activation occurs and, occasionally, an influx of immune cells goes into the central nervous system (CNS). Accumulation of blood born immune cells at the side of the lesion is paralleled by activation of CNS-resident astrocytes and microglia, where they latter transform into phagocytic macrophages [6].

The use of lipoic acid (LA) on stroke and TBI animal models seems to be effective, restoring the BBB disruption and normalizing the astrocytic/microglial activation and glutathione (GSH) levels [7–9]. LA is well known as a natural cofactor for mitochondrial enzymes and is critical in breaking down fatty acids, which further enhance cellular energy efficiency. Recent findings obtained by our group show that LA works as a good neuroprotectant by acting as an antioxidant, increasing the antioxidant capacity of the tissue, decreasing the astroglial reaction, as well as the glial scar formation, promoting angiogenesis, and switching the regulation of several genes linked to cell survival and plasticity [10], but the microglial response is still unclear.

New controversies have also emerged such as the question of whether microglia are active or reactive players in neurodegenerative disease conditions. Some studies have been done to differentiate the inflammatory response from other biochemical processes in the development of secondary brain injuries and to explore what pathways in the inflammatory response mediate detrimental and/or protective effects following TBI [5]. It is now accepted that microglial cells can

be acutely blood-derived in the adults under certain pathological conditions [11]. In that sense, microglial cells have the potential to develop into full-blown macrophages [12].

Since local microglia, astrocytes, and infiltrated macrophages are the main effectors of the innate immune response in the CNS [4], understanding the process of glial response is critical for formulating effective preventive and therapeutic strategies against brain injuries [13]. For that reason, the aim of the present work is to study the long-term astroglial and microglial response when LA treatment is administered after brain injury.

2. Experimental Procedures

2.1. Experimental Animal Models. Adult male Wistar rats (Harlan, Italy) weighing 250 ± 25 g were housed (two rats per box) one week before starting the experiment. Rats were housed in controlled conditions of temperature (20°C) and humidity (60%), under constant light-dark cycles of 12 hours. Handling and care of animals were done according to the *Real Decreto* 1201/05 and supervised and approved by the Committee of Ethics and Experimental Procedures of the Universidad CEU-Cardenal Herrera. Unnecessary stress or pain was avoided as possible.

2.1.1. Surgery and Brain Cryoinjury. Rats were anesthetized with a mixture of ketamine (12 mg/kg), acepromazine (0.4 mg/kg), and fentanyl (0.02 mg/kg) that was injected intraperitoneally (i.p.). Once deeply anesthetized, rats were placed in a stereotaxic frame. The dorsal part of the skull was exposed and a craniotomy (2 mm of diameter) was drilled on stereotaxic coordinates anteroposteriorly, 0 mm from bregma, and laterally, 1.5 mm from medial line [14]. The brain cryoinjury was performed following the protocol described by Quintana et al. [15]. Thus, the cryoinjury (1 mm deep) was performed in the cerebral cortex by using a stainless steel probe (1 mm \varnothing) previously frozen in liquid nitrogen. The frozen probe was maintained within the brain tissue for 20 sec. Finally, animals were sutured with a skin stapler (6.9 \times 3.6 mm staples) and a mixture of buprenorphine (0.015 mg/kg) and metamizol (20 mg/kg) was i.p. administered after surgery.

Another group of rats were anesthetized, and the protocol described before was carried out (including the craniotomy), but rats were not cryoinjured. This group was considered as control group.

2.1.2. Experimental Groups and LA Administration. Cryoinjured rats were randomly selected immediately after the surgery. One group ($n = 12$) received a daily dose (100 mg/kg i.p. in NaCl 0.9%) of LA (Sigma Aldrich, Spain) for 7 days (CR + LA), starting the same day of surgery and the other group ($n = 12$) received the same volume of saline solution (NaCl 0.9% i.p.) for the same period of time (CR). Noncryoinjured rats ($n = 12$) received the same volume of saline (control).

2.1.3. Sacrifice and Tissue Preparation. One pool of animals was housed for 15 days and then sacrificed by an i.p. overdose

of pentobarbital (0.2 g/kg). Another pool was housed for 60 days and was sacrificed in the same way.

Once sacrificed, animals of 15 and 60 days ($n = 6$ for each group) were intracardially perfused with 100 mL of saline solution followed by 200 mL of 4% paraformaldehyde (PFA) in saline solution pH 7.5. Brains were removed and postfixed in the same fixative solution for 24 h at 4°C. Then, brains were cryoprotected by immersion in sucrose 30% in phosphate buffer saline (PBS) 0.01 M pH 7.1 solution for five days also at 4°C. Sections of 20 μ m thickness were serially obtained with a cryostat (Leica) and mounted in glass slides. Sections were stored at -80°C.

2.2. Cytological Study

2.2.1. Hematoxylin-Eosine Staining. Haematoxylin-eosin staining was performed for histological characterization of the injured area by using brain sections from LA treated (CR + LA) and not treated animals (CR) at 60 days.

2.2.2. Immunofluorescence. Sections were selected and washed three times with PBS 0.1 M for 5 min at room temperature, blocked for 2 h with 20% fetal bovine serum (FBS) in PBS-Triton 0.1%, and incubated at 4°C overnight with primary antibodies: anti-Collagen IV (1:200, Abcam, UK); anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:500, Dako Cytomation, Denmark); and anti-CD68 (ED1) (1:200, AbD Serotec, UK).

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

2.2.3. Immunocytochemical Staining. Sections were selected and rinsed for three times in PBS 0.1 M pH 7.5. In order to block unspecific binding sites and endogenous peroxidase, sections were incubated in darkness for 15 min in a solution of 3% H₂O₂-10% Methanol in PBS-Triton 0.1%. Afterwards, sections were incubated overnight at 4°C with specific primary antibody anti-rabbit Ibal (Wako Chemicals, Germany) and 20% FBS in PBS-Triton 0.1% (1:200). Then sections were incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG antibody (1:200, Vector Lab, UK) in darkness for 2 h. After being washed three times in PBS, sections were incubated with avidin-biotin-peroxidase complex (Vector Lab, UK) for 1 h. Staining was developed with DAB (Vector Lab, UK) for time enough to make visible the marked cells. The reaction was stopped then by washing with distilled H₂O and sections were washed with PBS to remove the excess. Finally, sections were dehydrated and coverslipped and images were taken with a Leica microscope.

2.3. Quantification and Statistical Analysis. Immunocytochemical and immunofluorescence images were quantified

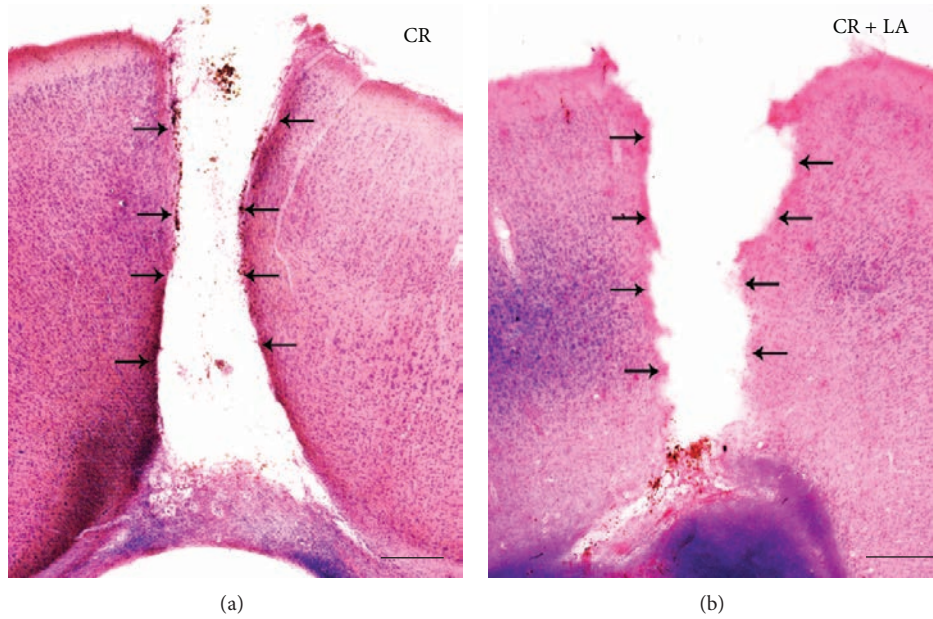


FIGURE 1: Hematoxylin-eosine staining of the injury area 60 days after the brain cryoinjury in untreated animals (a) and LA treated animals (b). Arrows indicate the edge of the injury. Scale bar: 500 μm .

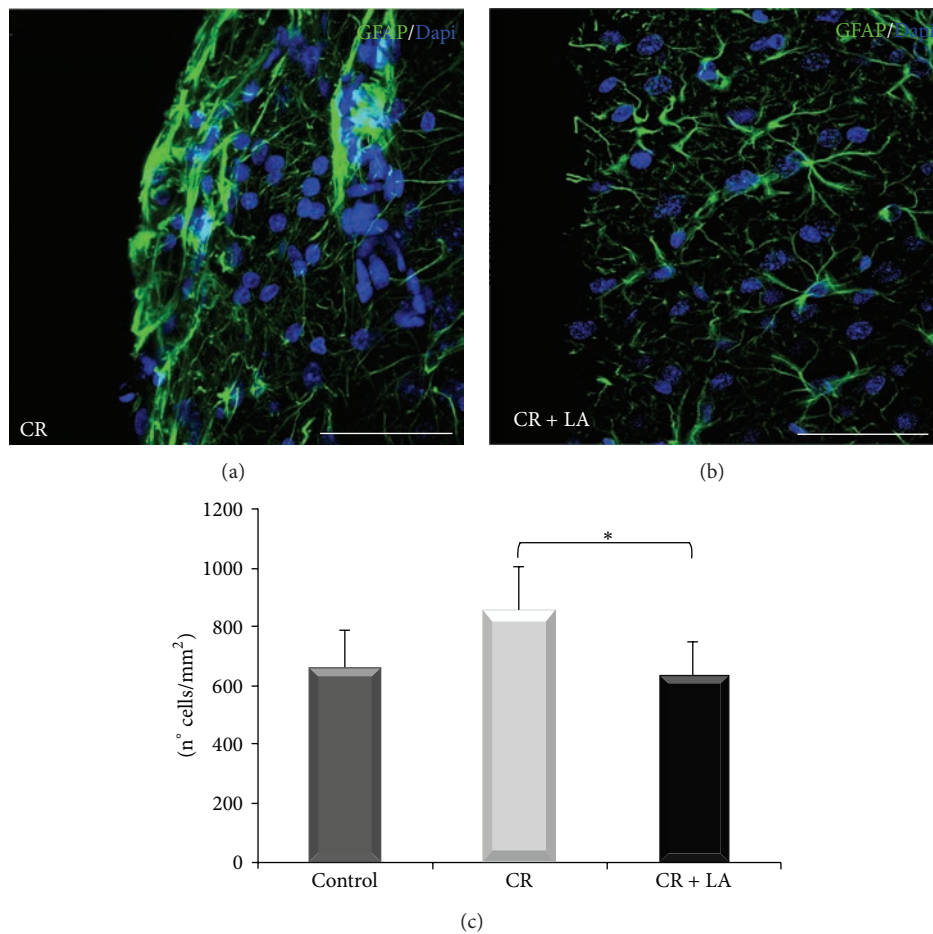


FIGURE 2: Immunofluorescence for GFAP (astrocytes in green) in nontreated animals (a) and LA treated animals (b), 60 days after the brain cryoinjury. Nuclei become evident with Dapi (blue). Quantification of astrocyte cell density ($\text{n}^\circ \text{ cells/mm}^2$) (c) Scale bar: 50 μm . * $P < 0.05$.

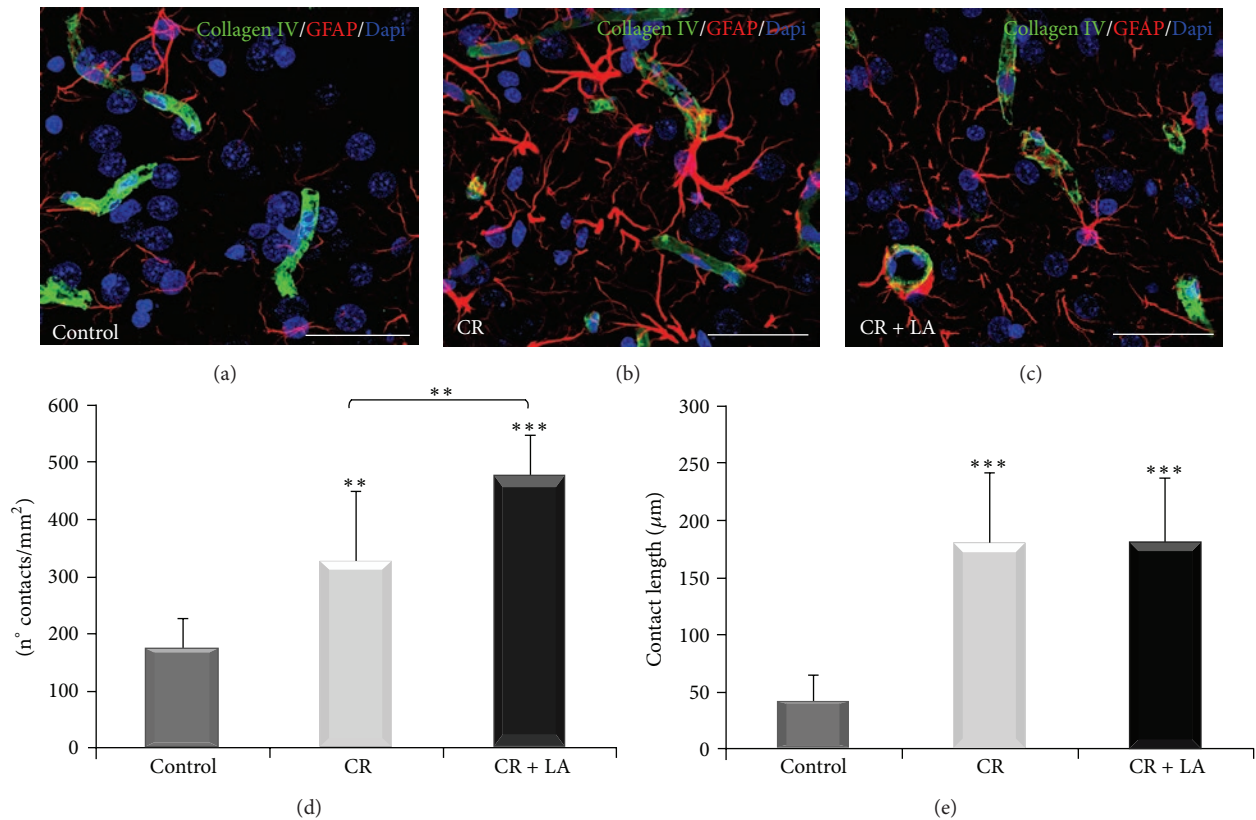


FIGURE 3: Immunofluorescence for GFAP (astrocytes in red) and Collagen IV (blood vessels in green) in control animals (a), nontreated animals (b), and LA treated animals (c) Nuclei become evident with Dapi (blue). Quantification of the density of contacts (n° contacts/mm²) established between astrocytes and blood vessels (d) and the total length of the contacts (μm). (e) Scale bar: 20 μm. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

with ImageJ 1.44i for Mac. The quantifications were performed in the first 500 μm from the injury limit. Six images were randomly taken of 4 sections of each animal ($n = 6$) and the number of cells was determined by the nuclei presence and referred to the total area quantified (n° cells/mm²).

The number and length of the contacts were quantified with the program Leica LAS AF Lite for Windows Vista. Images were randomly taken of the first 500 μm from the injury limit of different zones around the injured area. Regions of interest (ROIs) were identified when both colour markers (red and green) were overlapped. Each ROI was considered as a contact and the number of contacts (number of ROIs) referred to the total area measured (n° contacts/mm²). Total length of contacts (μm) was quantified by adding the length of each individual ROI.

To perform the statistical analyses of the data, GraphPad Prism 4 for Mac was used. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA followed by least significance differences test. Data are represented as mean ± standard deviation, and differences are considered significant at $P < 0.05$. Asterisks over the bars indicate statistically significant differences versus control.

3. Results

3.1. Histological Analysis of Brain Injury. Haematoxylin-eosin staining of the brains was done, at 60 days, in order to evaluate

the histology of the tissue. We found that untreated animals showed a perfectly delimited cystic cavity (Figure 1(a)), while LA treated animals showed an uneven edge of the injury (Figure 1(b)). These results are in agreement with those obtained previously by our group where we found that the LA treatment avoided the formation of the glial scar and produced growing of the neural tissue inside the cystic cavity [10].

3.2. Glial Reactivity after Brain Injury. As has been seen before, our group has previously reported that the short-term effects of LA avoid the glial scar formation after the brain injury [10]. With the aim of evaluating the long-term astroglial reactivity after the brain injury, immunohistochemistry for GFAP (astrocytes) was carried out 60 days after the injury. In this case, untreated group (Figure 2(a)) still showed a marked astroglial scar in the injury limit while LA treated group (Figure 2(b)) presented a few astrocytes randomly distributed across the adjacent tissue. Moreover, a statistically significant decrease ($P < 0.05$) in the density of astroglial cells (Figure 2(c)) was shown in LA treated animals compared with nontreated animals.

3.3. Blood-Brain Barrier Formation after Brain Injury. It has been previously described that the BBB is affected after a TBI [3]. In order to evaluate the organization of the BBB,

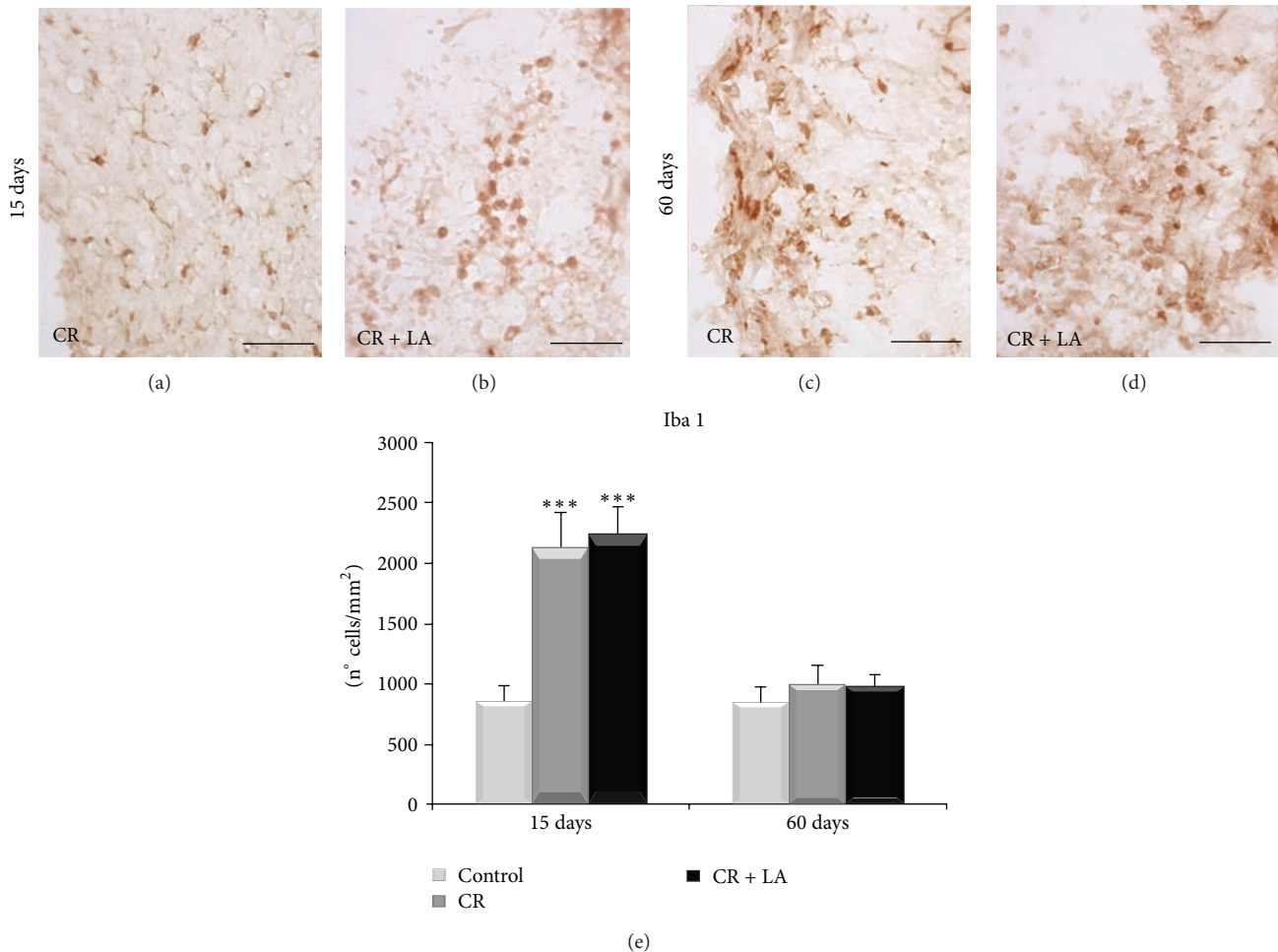


FIGURE 4: Immunocytochemistry for Iba1 (microglia) at 15 and 60 days in nontreated animals ((a) and (c), resp.) and LA treated animals ((b) and (d), resp.). Quantification of microglial cell density (n° cells/mm²) (e). Scale bar: 100 μm. ****P* < 0.001.

immunohistochemistry for Collagen IV (blood vessels) and GFAP (astrocytes) was done in control animals (Figure 3(a)), untreated animals (Figure 3(b)), and LA treated animals (Figure 3(c)) 15 days after the injury. The quantification of the number of contacts (n° contacts/mm²) established between astrocytes and blood vessels (Figure 3(d)) showed that both untreated and LA treated groups presented a statistical significant increase (*P* < 0.01 and *P* < 0.001, resp.) compared with control group. Moreover, LA treated group showed an increase (*P* < 0.01) compared with untreated group.

In addition, when the total length (μm) of the contacts (Figure 3(e)) was measured, a statistically significant increase was observed in both experimental groups (CR and CR + LA) compared with control group (*P* < 0.001).

3.4. Microglial Response. Microglial cells are the cell brain responsible of the immune response. Those were revealed by immunostaining with the marker Iba1 in order to see cell morphology (Figure 4). Images taken 15 days after the injury showed ramified microglia in untreated animals (Figure 4(a)) but amoeboid microglia cells were present in LA treated group (Figure 4(b)). On the other hand, images taken at 60 days revealed amoeboid microglial cells in both groups

(Figures 4(c) and 4(d)). The quantification of the density of Iba1 positive cells (Figure 4(e)) showed a statistically significant increase in both experimental groups 15 days after the injury (*P* < 0.001) but showed no statistical differences after 60 days.

In addition, phagocytic cells were evaluated through immunohistochemistry for ED1 15 and 60 days after the injury (Figures 5(a)–5(d)). The quantification of the density of cells (n° cells/mm²) (Figure 5(e)) showed a statistically significant increase in both experimental groups 15 days after the injury (*P* < 0.01 and *P* < 0.001, resp.). Moreover, these phagocytic cells were statistically significantly increased in LA treated group compared with nontreated group (*P* < 0.05). Despite that, after 60 days, an increase in the density of ED1 positive cells was observed in untreated animals, reaching the same values as LA treated animals.

4. Discussion

After a TBI, inflammatory molecules from injured and dead cells are released to the extracellular medium, which elicits microglia and astroglia activation [2, 10].

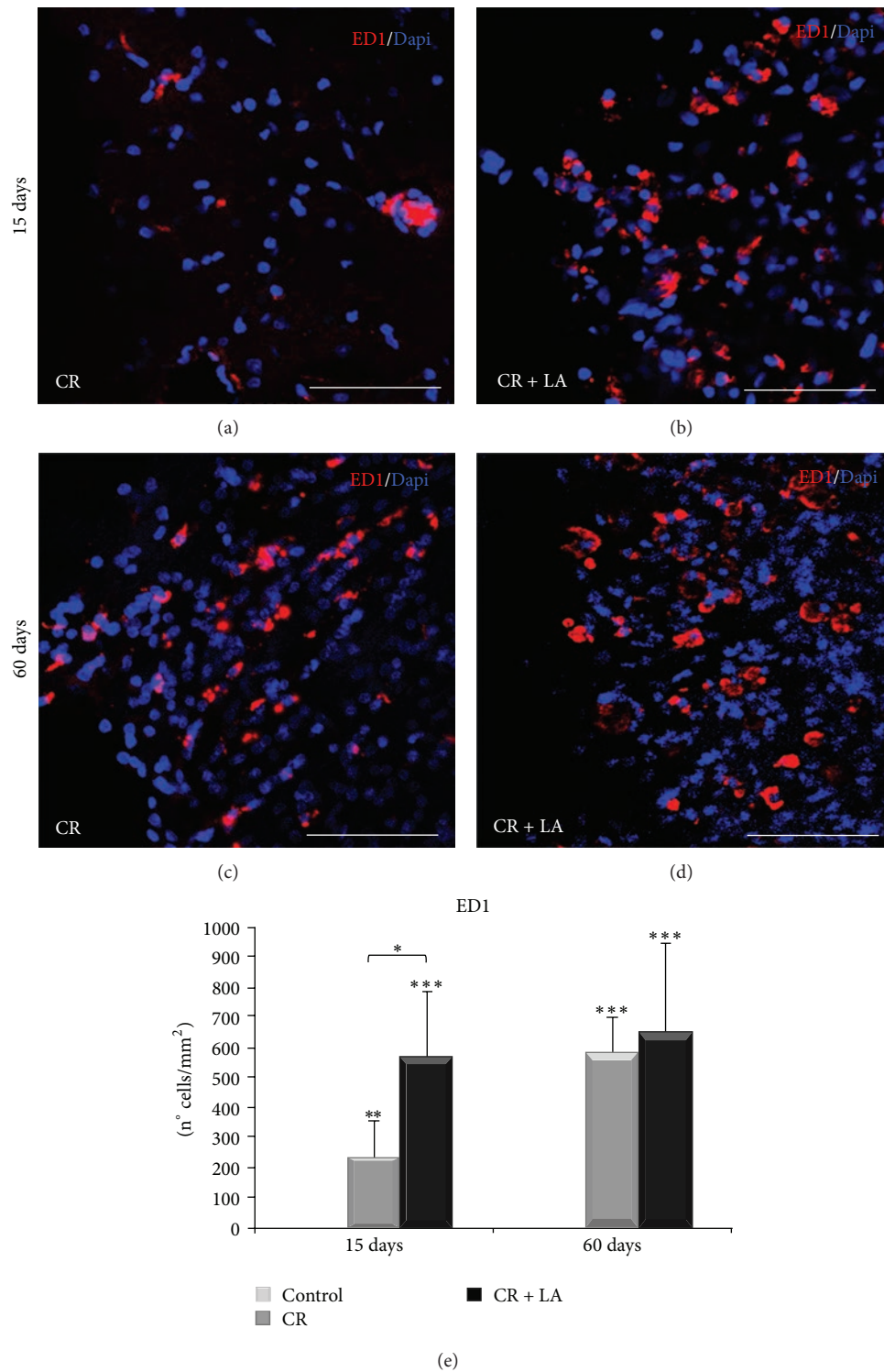


FIGURE 5: Immunofluorescence for ED1 marker (red) at 15 and 60 days in nontreated animals ((a) and (c), resp.) and LA treated animals ((b) and (d), resp.). Nuclei become evident with Dapi (blue). Quantification of cell density (n° cells/mm²) of activated microglia/macrophage (e) Scale bar: 200 μ m. ** $P < 0.05$; *** $P < 0.01$.

Astrocytes respond to all forms of CNS insults through a process referred to as reactive astrogliosis [16]. It is well documented that the reactive astrocytes undergo hypertrophy; upregulate intermediate filaments composed of nestin, vimentin, and glial fibrillary protein (GFAP); and give rise to the glial scar [17]. Previous studies of our group showed that LA decreases the astroglial reactivity and avoids the glial scar formation 15 days after the brain injury [10]. In the present work we have shown that the glial scar still remains even 60 days after the injury while LA treatment avoids completely the scar formation in the long term and astroglial cells are randomly distributed across the adjacent tissue.

Moreover, it has been reported that the secondary damage detached from TBI contributes to the BBB disruption [7]. Herein, we have seen that LA promotes the formation of contacts between the endothelial cells and astrocytes, but we have shown that the length of contacts is increased after a TBI. Despite these findings we are not able to say if there is a restoration of the BBB; however some authors affirm that the use of LA on TBI and stroke animal models showed a restoration of the BBB disruption and normalization of the astrocytic/microglial activation and GSH levels [7–9].

Otherwise, activation of the immune system in the CNS has become increasingly recognized as a key component of the normal process of aging and also of the pathological onset and progression of many neurological disorders including TBI and neurodegenerative diseases [18]. Engulfment of apoptotic cells has traditionally been attributed to professional phagocytes, such as macrophages, microglia, and dendritic cells [16]. Recent advances in microglial biology have revealed that microglia may have important homeostatic functions [19]; in normal brain they are very active in surveillance of the normal neuronal environment and are the first cells to respond to any subtle changes [20]. It is well known that, under pathological conditions, microglia are rapidly activated and expanded in population to respond to the injury or stimulus. While ramified microglia are not in physical contact to each other, some authors have argued that their distribution within the brain allows them to “sense” their immediate surroundings. Individual cells could then respond to chemical or mechanical signals to activate the response to injury [21].

Herein, we have identified microglia morphology, to discriminate ramified microglia (resting) and amoeboid microglia (phagocytic). We have seen that microglia increased at 15 days and decreased at 60 days after the brain injury. However, only untreated group at 15 days showed ramified microglia. In addition, phagocytic cells were significantly increased in LA treated group at 15 days, while untreated group showed an increase at 60 days. In view of these results, we hypothesize that LA administration after brain injury avoids the glial scar formation, promoting the restoration of the tissue through early immune response developed by microglia.

Even though there is currently an open question about the role of the microglial cells, in general, it is evident that microglia play both detrimental and beneficial roles in brain injury, depending upon the time and severity of the inflammation. But on the other hand, there is also

growing evidence showing that, under certain circumstances, microglia could be neuroprotective [22–24] and promote adult neurogenesis [25, 26]. However, it has been reported that innate immune response can also be beneficial in brain ischemia [27, 28]. Indeed, microglia have been shown to be neurosupportive by the uptake of glutamate [29], the removal of cell debris [30], and the engulfment of polymorphonuclear neutrophils [31].

These findings, supported by our previous results, sustain LA treatment as a new regenerative strategy after brain injury and maybe other neurodegenerative diseases. However more studies should be done on the microglia response to clarify its role in this field.

5. Conclusion

Herein, we have reported that LA administration avoids the glial scar formation in the long term and promotes the BBB formation. Moreover, increases the microglial population early, but those decreases 60 days after the injury. In addition, early phagocytic cell appears close to the injury when LA is administered, while its absence delays the immune response activation and restoration of the tissue. All these findings lead us to better understanding of the immune response in the CNS after brain injury and represent a crucial step to the development of appropriate strategies against brain injury and other degenerative diseases.

Acknowledgments

José Miguel Soria acknowledges funding by Programa de Ayudas a la Investigación Científica Ramón Areces (2009), Copérnico-Santander (PRCEU-UCH/COP01/08) Universidad CEU Cardenal Herrera, and also Programa de Ayudas a la Investigación Universidad CEU Cardenal Herrera (PRCEU-UCH16/09). This work has been supported also by the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2010-21274 and RYC2010-06729).

References

- [1] M. Das, S. Mohapatra, and S. S. Mohapatra, “New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury,” *Journal of Neuroinflammation*, vol. 9, article 236, 2012.
- [2] D. J. Loane and K. R. Byrnes, “Role of microglia in neurotrauma,” *Neurotherapeutics*, vol. 7, no. 4, pp. 366–377, 2010.
- [3] D. Shlosberg, M. Benifla, D. Kaufer, and A. Friedman, “Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury,” *Nature Reviews Neurology*, vol. 6, no. 7, pp. 393–403, 2010.
- [4] A. Minagar, P. Shapshak, R. Fujimura, R. Ownby, M. Heyes, and C. Eisdorfer, “The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis,” *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 202, no. 1–2, pp. 13–23, 2002.
- [5] B.-M. Bellander, O. Lidman, M. Ohlsson, B. Meijer, F. Piehl, and M. Svensson, “Genetic regulation of microglia activation,

- complement expression, and neurodegeneration in a rat model of traumatic brain injury," *Experimental Brain Research*, vol. 205, no. 1, pp. 103–114, 2010.
- [6] M. Koshinaga, Y. Katayama, M. Fukushima, H. Oshima, T. Suma, and T. Takahata, "Rapid and widespread microglial activation induced by traumatic brain injury in rat brain slices," *Journal of Neurotrauma*, vol. 17, no. 3, pp. 183–192, 2000.
- [7] H. Z. Toklu, T. Hakan, N. Biber, S. Solakoğlu, A. V. Ögünç, and G. Şener, "The protective effect of alpha lipoic acid against traumatic brain injury in rats," *Free Radical Research*, vol. 43, no. 7, pp. 658–667, 2009.
- [8] O. Gonzalez-Perez, R. E. Gonzalez-Castaeda, M. Huerta et al., "Beneficial effects of α -lipoic acid plus vitamin E on neurological deficit, reactive gliosis and neuronal remodeling in the penumbra of the ischemic rat brain," *Neuroscience Letters*, vol. 321, no. 1-2, pp. 100–104, 2002.
- [9] G. Schreibelt, R. J. P. Musters, A. Reijerkerk et al., "Lipoic acid affects cellular migration into the central nervous system and stabilizes blood-brain barrier integrity," *Journal of Immunology*, vol. 177, no. 4, pp. 2630–2637, 2006.
- [10] B. Rocamonde, S. Paradells, J. M. Barcia et al., "Neuroprotection of lipoic acid treatment promotes angiogenesis and reduces the glial scar formation after brain injury," *Neuroscience*, vol. 224, pp. 102–115, 2012.
- [11] J. Zhang, Q. S. Xiang, S. Echeverry, J. S. Mogil, Y. de Koninck, and S. Rivest, "Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain," *The Journal of Neuroscience*, vol. 27, no. 45, pp. 12396–12406, 2007.
- [12] M. B. Graeber and W. J. Streit, "Microglia: biology and pathology," *Acta Neuropathologica*, vol. 119, no. 1, pp. 89–105, 2010.
- [13] L.-J. Chew, A. Takanohashi, and M. Bell, "Microglia and inflammation: impact on developmental brain injuries," *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, vol. 12, no. 2, pp. 105–112, 2006.
- [14] G. Paxinos and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, San Diego, Calif, USA, 1986.
- [15] A. Quintana, M. Giralt, A. Molinero, I. L. Campbell, M. Penkowa, and J. Hidalgo, "Analysis of the cerebral transcriptome in mice subjected to traumatic brain injury: importance of IL-6," *NeuroImmunoModulation*, vol. 14, no. 3-4, pp. 139–143, 2007.
- [16] C. Lööv, L. Hillered, T. Ebendal, and A. Erlandsson, "Engulfing astrocytes protect neurons from contact-induced apoptosis following injury," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 3, Article ID e33090, 2012.
- [17] A. Buffo, C. Rolando, and S. Ceruti, "Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential," *Biochemical Pharmacology*, vol. 79, no. 2, pp. 77–89, 2010.
- [18] D. G. Hernandez-Ontiveros, N. Tajiri, S. Acosta, B. Giunta, J. Tan, and C. V. Borlongan, "Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury," *Frontiers in Neurology*, vol. 4, article 30, 2013.
- [19] U.-K. Hanisch and H. Kettenmann, "Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain," *Nature Neuroscience*, vol. 10, no. 11, pp. 1387–1394, 2007.
- [20] D. Davalos, J. Grutzendler, G. Yang et al., "ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo," *Nature Neuroscience*, vol. 8, no. 6, pp. 752–758, 2005.
- [21] D. van Rossum and U.-K. Hanisch, "Microglia," *Metabolic Brain Disease*, vol. 19, no. 3-4, pp. 393–411, 2004.
- [22] J. Neumann, M. Gunzer, H. O. Gutzeit, O. Ullrich, K. G. Reymann, and K. Dinkel, "Microglia provide neuroprotection after ischemia," *FASEB Journal*, vol. 20, no. 6, pp. 714–716, 2006.
- [23] F. Imai, H. Suzuki, J. Oda et al., "Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 27, no. 3, pp. 488–500, 2007.
- [24] M. Lalancette-Hebert, G. Growing, A. Simard, Y. C. Weng, and J. Kriz, "Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain," *The Journal of Neuroscience*, vol. 27, no. 10, pp. 2596–2605, 2007.
- [25] B. J. Kim, M.-J. Kim, J.-M. Park et al., "Reduced neurogenesis after suppressed inflammation by minocycline in transient cerebral ischemia in rat," *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 279, no. 1-2, pp. 70–75, 2009.
- [26] P. Thored, U. Heldmann, W. Gomes-Leal et al., "Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke," *GLIA*, vol. 57, no. 8, pp. 835–849, 2009.
- [27] Q. Wang, X. N. Tang, and M. A. Yenari, "The inflammatory response in stroke," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 184, no. 1-2, pp. 53–68, 2007.
- [28] H. Watanabe, H. Abe, S. Takeuchi, and R. Tanaka, "Protective effect of microglial conditioning medium on neuronal damage induced by glutamate," *Neuroscience Letters*, vol. 289, no. 1, pp. 53–56, 2000.
- [29] K. Nakajima, S. Yamamoto, S. Kohsaka, and T. Kurihara, "Neuronal stimulation leading to upregulation of glutamate transporter-1 (GLT-1) in rat microglia in vitro," *Neuroscience Letters*, vol. 436, no. 3, pp. 331–334, 2008.
- [30] G. Stollg and S. Jander, "The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS," *Progress in Neurobiology*, vol. 58, no. 3, pp. 233–247, 1999.
- [31] J. Neumann, S. Sauerzweig, R. Röncke et al., "Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege," *The Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 23, pp. 5965–5975, 2008.

ANEXO III

ORIGINAL ARTICLE

Lipoic acid and bone marrow derived cells therapy induce angiogenesis and cell proliferation after focal brain injury

Sara Paradells¹, Ivan Zipanic¹, María Magdalena Martínez-Losa², María Ángeles García Esparza⁴, Francisco Bosch-Morell^{1,3}, Manuel Alvarez-Dolado², & José Miguel Soria¹

¹Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad CEU Cardenal Herrera, Moncada, Spain, ²Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Sevilla, Spain, ³Fundación Oftalmológica del Mediterráneo, Valencia, Spain, and ⁴Departamento de Farmacia, Universidad CEU Cardenal Herrera, Moncada, Spain

Abstract

Introduction: Traumatic brain injury is a main cause of disability and death in developed countries, above all among children and adolescents. The intrinsic inability of the central nervous system to efficiently repair traumatic injuries renders transplantation of bone marrow-derived cells (BMDC) a promising approach towards repair of brain lesions. On the other hand, many studies have reported the beneficial effect of Lipoic acid (LA), a potent antioxidant promoting cell survival, angiogenesis and neuroregeneration.

Methods: In this study, the cortex of adult mice was cryo-injured in order to mimic local traumatic brain injury. Vehicle or freshly prepared BMDC were grafted in the cerebral penumbra area 24 hours after unilateral local injury alone or combined with intra-peritoneal LA administration as a new regenerative strategy.

Results: Differences were found in the process of cell proliferation, angiogenesis and glial scar formation after local injury depending of the applied treatment, either LA or BMDC alone or in combination.

Conclusion: The data presented here suggest that transplantation of BMDC is a good alternative and valid strategy to treat a focal brain injury when LA could not be prescribed due to its non-desired secondary effects.

Keywords

Angiogenesis, antioxidant, bone marrow derived cell, brain injury, cell transplantation, lipoic acid, neuroprotection, traumatic brain injury

History

Received 28 January 2014

Revised 8 September 2014

Accepted 2 October 2014

Published online 5 November 2014

Background

Traumatic brain injury (TBI) is a main cause of disability and death in developed countries, above all among children and adolescents [1–4]. The initial traumatic insult (i.e. severing of nerve cells and blood vessels) is followed by multiple changes, including haemorrhage, oedema, intracranial hypertension, ischaemia and hypoxia. This primary injury provokes a complex and damaging cascade of biochemical and immunological reactions resulting in secondary damage characterized by extensive neuronal and glial degeneration. This secondary damage, besides gliosis and the release of pro-inflammatory factors, also implies a strong increase in free radicals, metabolic alterations and cerebrovascular dysfunction that enhances the effects of tissue ischaemia due to traumatic injury and cerebral oedema after the rupture of the blood–brain barrier (BBB).

Studies based on various experimental trauma models in rodents, including cryogenic lesions, have consistently

demonstrated that the volume of tissue affected by secondary damage increases over time [5–9]. This region, potentially rescuable by a therapeutic intervention, is the perilesional rim surrounding the degenerating domain, also called penumbra [10]. The pathochemical and pathophysiological cascade of secondary events occurs in the time interval in which potentially salvageable penumbra persists and marks the therapeutic window [11]. Therefore, acting in this limited time is extremely important [12–14].

In spite of the major advances in understanding the pathophysiology of TBI, currently there is no specific clinically effective reconstruction strategy, hence the recovery of these injuries is an immense problem and its socio-economic impact is enormous [15–17]. Oxidative stress is the main pathophysiological mechanism responsible for secondary injury in neurotrauma [18, 19]. Although there is no perfect antioxidant itself, by its biochemical characteristic, the α -Lipoic acid (LA) comes close to this ideal. The LA and its reduced form—dihydrolipoic acid, meet all the criteria for an ideal antioxidant because they effectively protect cells against reactive oxygen species (ROS) induced damage. Unlike other antioxidants, LA is both water and lipid soluble, hence able to readily cross the BBB, having the unique ability to neutralize free radicals within cellular membranes, cytosol

Correspondence: José Miguel Soria, PhD, Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad CEU Cardenal Herrera, Avenida del Seminario s/n, Moncada 46313, Valencia, España. Tel: +34 96 136 90 00 Ext. 1361. Fax: +34 96 139 52 72. E-mail: jose.soria@uch.ceu.es

and extracellular space. Moreover, LA interacts with other endogenous antioxidants and can regenerate them. For this reason, LA is called an antioxidant of antioxidants [20].

Recently, this group has demonstrated that LA is a suitable pharmacological strategy for neuroprotection and neovascularization processes after focal brain injury. In this sense, LA restored glutathione form (GSH) levels after a brain injury, reduced apoptosis and glial reactivity, increased proliferation and stimulated angiogenesis [21].

Even though the brain injury has shown some self-restorative capacity, the number of neurons produced is insufficient to re-establish the loss of cerebral parenchyma damage and restore cortical function [22, 23]. Interestingly, recent studies indicate that cell therapy could be a valid approach to potentially recover from diverse central nervous system (CNS) disorders such as TBI [24], which currently is not possible by traditional therapeutic strategies [25]. It has been shown that, after cerebral ischaemia, bone marrow derived cells (BMDC) rapidly infiltrate the brain parenchyma, differentiating primarily to microglia [26–28] or endothelial cells [29, 30] and a limited number of cells has been reported that express astrocytic [31] and neuronal markers [27, 29, 32]. The recruitment of BMDC after stroke may represent an endeavour of endogenous self-repair. Thus, recruitment of these cells or progenitor populations may represent a new therapeutic strategy to stimulate re-vascularization and repair or supply pathways for therapeutic gene delivery [33].

On the other hand, the transplanted mesenchymal stromal cells (MSC) can promote directly or indirectly neuroprotection or neuroregeneration and angiogenesis acting as mini-pumps delivering beneficial factors to their microenvironment in an injured brain [34]. It has been shown that trophic factors are over-expressed in some neurodegenerative models [35–37]. The expression of some of these factors such as Brain-Derived Neurotrophic factor (BDNF) or Vascular Endothelial Growth factor (VEGF) play an important role in the size of neuronal or glial populations in both developing and adult brains. In addition, it has been proved that MSC produce neurotrophic cytokines, such as Hepatocyte Growth factor (HGF) [38], VEGF [39], Nerve Growth factor (NGF) [40], BDNF [38, 40], basic Fibroblast Growth factor (bFGF) [41] and Insulin Growth factor-1 (IGF-1) [42], important in the process of neurogenesis and angiogenesis. Furthermore, it has been suggested that release of Transforming Growth factor- β (TGF- β) helps to reduce the formation of scar tissue and, thus, assist in restoration of cerebral blood flow and the BBB in models of TBI and stroke [33].

Interestingly, in a recent study, Kawabori et al. [43] highlight the two main routes of administration of BMDC: intracerebral (IC) vs. intravenous (IV), in a rat model of stroke injected 7 days after the injury is produced. This study clearly demonstrates that BMDC significantly enhance functional recovery after cerebral infarct in rats, when transplanted into the brain tissue.

The present work analyses the possible therapeutic benefit of BMDC applied after local brain damage induced by cryo-injury. Thus, angiogenesis, proliferation and scar formation were studied after application of these cells and their effects were compared with those reported by LA treatment.

In addition, a possible synergic effect was studied between BMDC and LA administration after focal brain injury.

Methods

Animals

CD-1 adult male mice (6 weeks old) were obtained from Harlan (Barcelona, Spain), bred and housed in a temperature-controlled room with access to food and water *ad libitum* in CABIMER animal facility.

GFP-positive (GFP⁺) transgenic mice (Tg(CAG-EGFP)B5Nagy/J_N^o 003115) proceed from Jackson laboratory and the breeding colony were kept at the CABIMER animal facility.

All animal procedures were carried out in accordance with the Spanish legislation (RD 1201/05) and the guidelines of the CABIMER animal care committee.

Brain cryo-injury

Animals were anaesthetized with an i.p. injection of anaesthetic cocktail (Ketamine 50 mg kg⁻¹, Acepromizine 1 mg kg⁻¹ and Xylazine 5 mg kg⁻¹ of body weight (b.wt.) and placed in a stereotaxic fixation frame (Digital Lab Standard Stereotaxic, Wood Dale, IL). The dorsal part of the skull was exposed and drilled unilaterally on the right side where the brain cryo-injury was performed following the protocol described by Quintana et al. [44]. Briefly, a 28 gauge stainless steel probe deep cold in liquid nitrogen (−183 °C) was penetrated stereotaxically through the right fronto-parietal cortex (co-ordinates from bregma L: +1.5 mm; A: −0.1 mm; D: −1.5; according to the compact mouse brain atlas by Paxinos and Franklin [45] (Figure 1A). The steel was then retracted and re-inserted twice and left inside the cortical parenchyma for 30 seconds. Finally, the incision was sealed with veterinary-grade tissue adhesive and animals received analgesia (Metamizol 20 mg kg⁻¹ b.wt.) on the day of the surgery and every 24 hours thereafter for 5 consecutive days. The control group went through the same procedure as described above (drilled right hemisphere), but they were not cryo-injured.

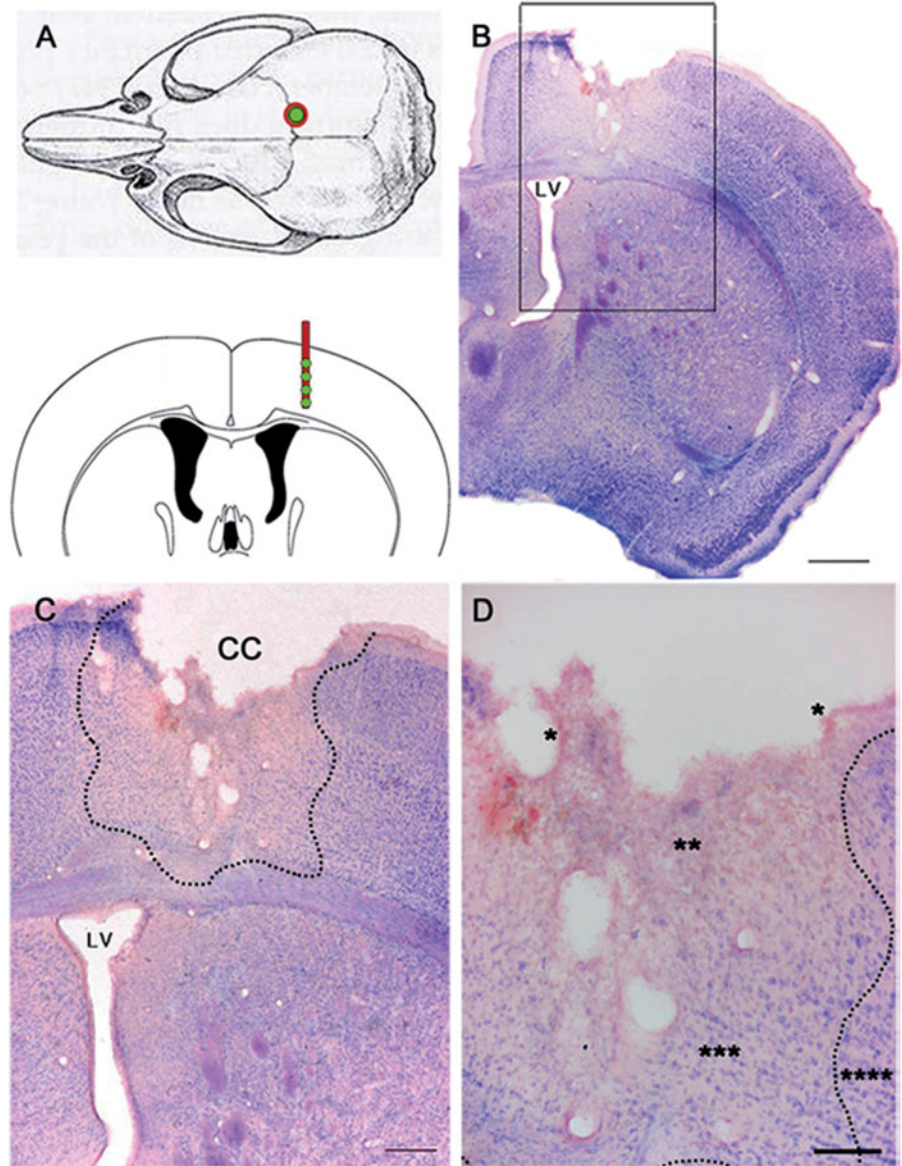
Bone marrow extraction and transplantation

Bone marrow extraction and transplantation was performed 24 hours after cryo-injury. Bone marrow cells were collected from GFP⁺ transgenic mice by flushing tibias, femurs and iliac crest with Phosphate-buffered saline (PBS; 0.1 M, pH 7.2). The cell suspension was passed through a 50 μ m nylon filter to remove tissue debris and fibres. Thus, obtained bone marrow derived cells were washed with PBS followed by erythrocyte lysis by osmotic shock with ammonium chloride at room-temperature (RT). Cell number and viability (~90%) was checked by trypan blue exclusion before transplantation. Thereby, freshly obtained complete BMDC suspension was used for the subsequent cell transplantation.

Highly concentrated BMDC suspension (~5 \times 10⁵ cells μ l⁻¹) was front-loaded into micro-syringe (Hamilton needle 7731-01 RN NDL, 26G) and administrated with the rate of 0.84 μ l min⁻¹ guided by a stereotaxic apparatus. The 0.14 μ l volume of cell suspension was released in the

Figure 1. Localization of the cryo-injured and cell transplantation site and morphological characterization of the mouse primary cortex 8 days after focal cerebral injury.

(A) Schematic drawing of the site of skull perforation and position of the deep cold metal probe penetration on the right hemisphere (black dot). Coronal section view of the site of cortical transplantation of BMDC in cryo-injured area 0.1 mm anterior from the bregma, 1.5 mm lateral from the midline and four releasing points of the BMDC (1.4, 1.2, 1.0 and 0.8 mm) below the dura (grey dots). (B) Focal brain trauma after local cold-induced cortical injury in the proximity of the lateral ventricle (LV). (C) Magnification of the injured area shows primary damage delimited by cystic cavity (CC) and wider secondary damaged area denoted by a dot line. (D) Three progressive damaged areas: primary damaged characterized by scar tissue barrier (one asterisk), secondary damaged necrotic zone (two asterisks), potentially affected zone, corresponding to penumbra area (three asterisks) and not affected zone (four asterisks). Scale bars: (B) 500 μm ; (C) 200 μm and (D) 100 μm .



epicenter of each of the four points along the dorsal axis (D: $-1.4/-1.2/-1.0/-0.8$) and the probe was left in the place for an extra 2 minutes after each cell release and then withdrawn gently to minimize leakage of the cell suspension from the injection site. Thereby, cells were dispensed in four different depths, allowing a more uniform distribution in the cerebral parenchyma avoiding a non-specific secondary damage by large accumulation of cells in a single site and decreasing a risk of tissue tearing by injected volume.

Experimental groups, lipoic acid and bromodeoxyuridine administration

Mice were randomly selected immediately after cryo-injury surgery and five experimental groups were established. The first group (CR + LA, $n = 14$) received daily LA 100 mg kg^{-1} b.wt. i.p. (Sigma Aldrich; San Louis, MO) for 7 days starting the day after the cryo-injury. The second group (CR, $n = 14$) received the same volume of PBS i.p. during the same period of time. The third group (CR + BMDC, $n = 14$) received the transplant of BMDC and the same volume of PBS i.p. for

7 days starting 1 day after the cryo-injury. The fourth group (CR + BMDC + LA, $n = 14$) received the transplant of BMDC in combination with daily LA 100 mg kg^{-1} i.p. administration for 7 days starting 1 day after the cryo-injury. Finally, the fifth group (Control, $n = 14$) was comprised of sham-operated mice that received the same volume of PBS i.p. and/or the same number and volume of BMDC. To assess cell proliferation all animals received an i.p. dose of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU, Sigma Aldrich; 50 mg kg^{-1} b.wt) the third day after the surgery during 5 consecutive days and were killed 1 day after the last BrdU dose.

Histological staining

Part of the animals of each group ($n = 5$) were intra-cardially perfused with 4% Paraformaldehyde 8 days after cryo-injury (d.a.c.) and the other ($n = 5$) 16 d.a.c. The remaining four animals forming each of the groups were destined for further biomolecular analyses by means of western blot assays.

Haematoxylin-eosin staining was performed on the brain sections from each group sacrificed 8 d.a.c. in order to confirm morphology and location of the injured area.

Cytological study

Immunohistochemical procedures

Brains of animals that were intra-cardially perfused with 4% Paraformaldehyde 8 or 16 d.a.c. were removed, post-fixed overnight at 4 °C in the same fixative solution and sectioned coronally (50 µm) in six series using a Vibratome (Leica, Saint Louis, MO). Free-floating brain sections were incubated with blocking buffer (BB) (PBS containing 10% foetal bovine serum and 0.1% Triton X-100) for 1 hour at RT followed by overnight incubation at 4 °C with the following primary antibodies: rat anti BrdU (1:200; Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-Collagen IV (1:200, Abcam), rabbit anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:500; Dako, Glostrup, Denmark) and rabbit anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1, 1:200; Wako, Japan). Successively, sections were rinsed in PBS and were incubated with corresponding secondary biotinylated antibody (1:200; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) in BB for 1 hour followed by 1 hour incubation in avidin-biotin-peroxidase complex (ABC, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) at RT. Staining was developed with diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) and the reaction was stopped by washing with PBS. Afterwards, sections were dehydrated and coverslipped. Images were acquired with a Nikon DS-Fi-1 camera coupled to a Leica DM 2000 Microscope. For co-localization studies, sections were washed in PBS, blocked for 2 hours with BB and incubated at 4 °C overnight with the same primary antibodies described above. Alexa 488-conjugated goat anti-rat and Alexa 594-conjugated donkey anti-rabbit (1:200, both from Invitrogen, Spain) diluted in BB were used as secondary antibodies incubating for 2 hours at RT in the dark. Afterwards, sections were mounted with DAPI Vectashield (Vector, Burlingame, CA), coverslipped and images were taken with a Nikon Confocal Microscope.

Western blotting

Eight days after cryo-injury one pool of animals was used for the biochemical procedure: CR + BMDC, $n=4$; CR + BMDC + LA, $n=4$; CR + LA, $n=4$, CR, $n=4$ and Control, $n=4$. To obtain samples for western blots, brain tissue surrounding the wound as well as from a corresponding region in the cortex of the control group were dissected out by a punch (2 mm internal diameter). Therefore, tissue blocks of 2 mm diameter and 1.5 mm depth were extracted. This tissue was homogenated with a lysis buffer supplemented with DTT 1 mM, NaF 10 mM, Complete 1X and Na_2VO_4 1 mM, followed by centrifugation at 14 000 rpm for 20 minutes and the supernatant was collected. Electrophoresis was performed at 200 V for 75 minutes and transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Spain).

Western Blot was performed for collagen (COL4A2, 1:200; Santa Cruz, Dallas, TX). IgG HRP F (1:5000, Santa Cruz, Dallas, TX) was used as a secondary antibody. The reaction was revealed by ECL-Plus detection system (Amersham Biotech) and analysed with ImageQuant LAS 4000.

Quantification and statistical analysis

Quantification of GFP⁺ cell bodies was obtained from counts on a Leica DM 2000 fluorescent microscope. The total

number of grafted cells was achieved counting all GFP⁺ cells in all coronal sections of all grafted cryo-injured and control animals. Since some GFP⁺ cells clustered together in order to estimate its number reliably, in these areas cell counting was performed on a higher magnification (100×). Moreover, during the whole process of cell quantification, nuclei counterstaining with DAPI was used to easily identify cell nuclei.

Quantification of Collagen IV, GFAP and Iba 1 was estimated in all coronal sections presenting cryo-injury in the 100 µm strip from the injury limit and in the corresponding area of control animals and it was expressed as a percentage of the area occupied by immunostained cell bodies referred to the total quantified area. In the same area, quantification of number of blood vessels and blood vessels' diameter was estimated. The number of blood vessels was estimated as the total number of blood vessels referred to the total quantified area. On the other hand, the blood vessels' diameter was expressed as an average of blood vessels' diameter of all blood vessels positioned in the 100 µm strip from the injury limit, for each of the animal groups. Planimetric measurements of the cell body and total area were calculated with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Quantification of BrdU⁺ cells was performed under a Leica DM 2000 Microscope in the 100 µm strip from the injury limit and it was represented as a ratio of the total number of immunostained cell bodies referred to total quantified area.

Quantification of the cellular co-localization of BrdU and Collagen IV, GFAP and Iba 1 was estimated in all coronal sections presenting cryo-injury in the 100 µm strip from the injury limit and it was expressed as a percentage of double positive cells.

For the biochemical study the homogenates of each animal group ($n=4$) were done per duplicate and the densities of the bands (expressed as the ratio of COL4A2/Actina) were analysed with ImageQuant TL.

To perform the statistical analyses of the data, SPSS Statistics 17.0 was used. Statistical significances were assessed by one-way ANOVA followed by least significance differences (LSD) test for more than two groups. Data are represented as means ± standard deviation (SD) and differences are considered significant at $p < 0.05$. The first asterisk over the bars indicates a statistically significant difference vs. control and the second asterisk over the bars indicates a statistically significant difference vs. the cryo-injury group.

Results

Histological characterization of the injured area

As previously described in the materials and methods section, the cryo-injury protocol was performed on the right mouse hemisphere following the protocol described by Quintana et al. [44] (Figure 1A). In order to evaluate and characterize the morphology of this cortical lesion, a haematoxylin-eosin staining was performed 8 d.a.c. (Figure 1B).

Major magnification of the histological appearance on the ipsilateral hemisphere shows the location of the primary damage, characterized by a complete lack of cerebral

parenchyma along the penetration path of the deep-cold metal probe delimited by the cystic cavity (CC). The damage spreads throughout cerebral tissue, disrupting cortical layer configuration from superficial layer I to the striatum, dorsally to the lateral ventricle (LV). Due to later cryogenic effects at this time point, further extension of the tissue lesion, cortical depression and neurodegeneration were observed, changes characteristic of secondary brain damage expanding deeper until the *corpus callosum* (denoted by dotted line in Figure 1C).

Furthermore, when the area adjacent to the lesion is examined with more detail, specific evolution was observed of the neural tissue damage 8 d.a.c., distinguishing three progressive layers (Figure 1D). The outer layer (one asterisk) is formed of a scar tissue barrier circumscribing CC. Beneath the scar tissue is an appreciable wide secondary damaged zone (two asterisks) characterized by relevant absence of cellular nuclei and broad intercellular space. This zone continues with a perilesional rim surrounding the necrotic domain identifying cells that are in potential danger of delayed progression of brain damage (three asterisks). Finally, following this area there is the intact zone (four asterisks) composed by a dense population of neural tissue that has not suffered significant changes because of cortical injury. These histopathological findings are concurrent with the results previously published by this group [21].

Presence and distribution of BMDC in the injured area

One day after cryo-injury, a total of 5×10^5 GFP⁺ BMDC were transplanted per brain, employing the same stereotaxic co-ordinates used for cryo-injury. Analysis of grafted brains 8 d.a.c. revealed different distribution of GFP⁺ BMDC between cryo-injured and control animals (Figures 2A–C). In control (not cryo-injured) animals GFP⁺ cells modestly migrated in the cortical parenchyma surrounding the transplantation site (Figure 2a). Besides, in the marginal cortical area of these animals a few dense aggregations of BMDC have been identified, showing its tendency for self-assembling leading to poor migratory capacity (arrowheads in

Figure 2A). On the other hand, in the cryo-injured animals treated with cells (CR + BMDC and CR + BMDC + LA) GFP⁺ cells were detected concentrated around the injured area, extending a leading process toward the CC (Figures 2B'–C').

In order to quantify the survival rate of BMDC 8 d.a.c., the total number of GFP⁺ cells were counted in all grafted animals. Approximately 1.4% (2013.9 ± 1281.1) of the total number of grafted cells was found around the injured area in all grafted mice at that time point and no differences have been found in the number of GFP survived grafted cells between experimental and control groups. However, these data should be interpreted with caution as cell clusters (arrowheads in Figure 2A) observed in control animals could lead to over-estimation of its real number. This study also analysed the presence of these cells 16 d.a.c., but no GFP⁺ signal was detected in any of the grafted mice (data not shown).

Presence of new cells in the injured area

To measure the proliferation in the injured and penumbra area, the number of cells in S-phase was counted, injecting intraperitoneally a dose of BrdU the third day after the surgery during 5 consecutive days. Animals were killed 1 day after the last BrdU dose. The total number of BrdU⁺ cells that we found around the injured area was estimated in all experimental groups killed 8 d.a.c. Immunostaining against BrdU shows that BrdU⁺ cells in the control group are located only superficially, in proximity of meninges membrane (Figure 3A), nevertheless, in the rest of the experimental groups BrdU⁺ cells were found deeper inside the neural tissue, indicating its active proliferation within the injured area, non-excluding the possibility of new cells arrival from surrounding areas (Figures 3B–E).

The statistical analysis demonstrates a significant gain in the density of BrdU⁺ being expressed as a ratio vs. the control value (number of BrdU⁺ cells of each group/number of BrdU⁺ cells of control group). The results obtained were increased 3.9-fold in CR, which increased even more in each

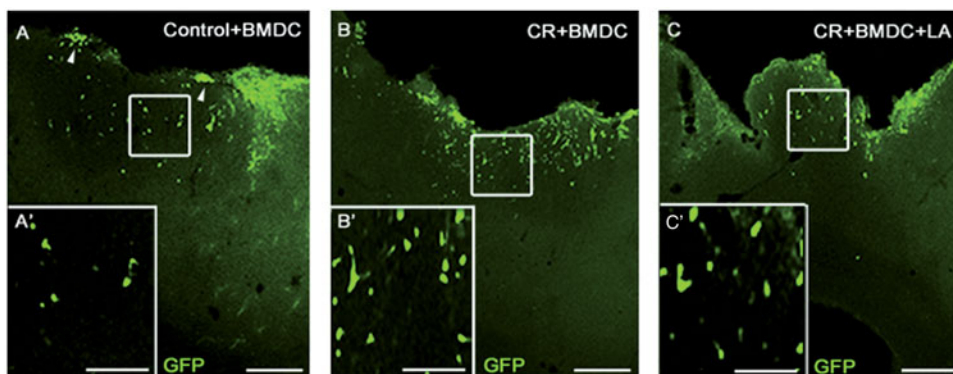


Figure 2. Distribution of transplanted GFP⁺ BMDC in the lesioned area 8 days after cryo-injury. (A) Grafted control without cryo-injury presents poor migration and accumulations of BMDC in the superficial zone (arrowheads). (B) Grafted cryo-injured animals presented GFP⁺ cells populating penumbra area concentrated around injured tissue. (C) Grafted cryo-injured animals treated with cells and lipoic acid where cells were extended within penumbra area around injured tissue. A smaller area was selected to show morphology of transplanted BMDC. (A') Magnified image of (A) corresponding to the box. (B') Magnified image of (B) corresponding to the box. (C') Magnified image of (C) corresponding to the box. Total number of GFP⁺ cells in all grafted animals 1308 ± 1289 from control + BMDC, 2740 ± 1631 from CR + BMDC and 1993 ± 922 from CR + BMDC + LA. Percentage of GFP⁺ cells in all grafted animals considering 100% from control + BMDC, it was found 209% from CR + BMDC and 152% from CR + BMDC + LA. Scale bars: (A, B, C) 75 µm; (A', B', C') 35 µm.

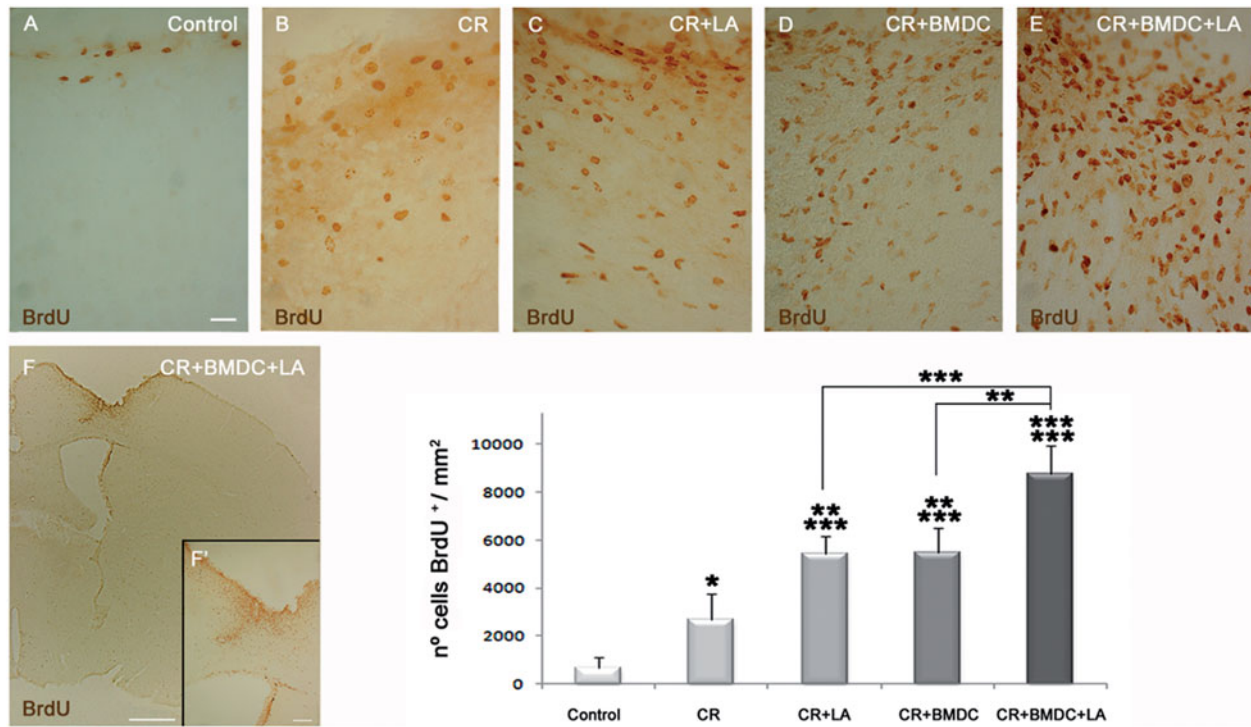


Figure 3. Presence of new cells in the lesioned area 8 days after cryo-injury. (A–E) Micrographs of BrdU⁺ cells immunolabelled with DAB showing an increase in proliferation in treated animals which became the most patent in the combined therapy group (CR + BMDC + LA). (F and F'); Larger panoramic view of injured hemisphere of BMDC and LA-treated animal. The graph shows quantification of the density of BrdU⁺ cells (n° cells mm⁻²) in the first 100 µm within the injured area. **p* < 0.05; ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001. Scale bars: (A–E) 10 µm; (F) 500 µm; (F'); 50 µm.

of the treated groups: 7.8-fold in CR + LA, 7.9-fold in CR + BMDC and 12.6-fold in CR + BMDC + LA, compared with the control (Control: 694 ± 422 cells mm⁻²). Furthermore, the results showed here demonstrate a significant increase (*p* < 0.01) in the group treated separately with LA or BMDC (CR + LA and CR + BMDC, respectively), which is even more evident (*p* < 0.001) in the group treated with a combined approach (CR + BMDC + LA) when compared with cryo-injured animals (CR). Besides, this group also found a statistically important increase of the density of BrdU⁺ cells compared to CR + BMDC and CR + LA groups (*p* < 0.01 and *p* < 0.001, respectively) (graph in Figure 3). The increment in the cell proliferation has local character since BrdU⁺ cells were found only in the zone adjacent to the injured area (Figures 3F and F'). Therefore, these results suggest a stimulating effect of injury on the local cell proliferation, which increases significantly when pharmacological (LA) or/and cell (BMDC) therapy is applied, even though, as mentioned before, one cannot exclude the possibility that these BrdU⁺ cells are actually new cells that have arrived from surrounding areas. The number of newborn cells increased drastically in the combination of these two therapies.

Molecular characterization of the newborn cells

In order to characterize the type of the new formed cells, double fluorescence immunostaining was performed. Qualitatively, co-localization studies of BrdU/Col IV (Figure 4A–D), BrdU/GFAP (Figure 4E–H) and BrdU/Iba1 (Figure 4I–L) show that new formed Col IV⁺ and GFAP⁺ cells were incorporated in the formation of new blood vessels

and capillary network, respectively. These findings suggest that newborn cells actively participate in recovery and re-organization of new blood vessels within the damaged area in all treated groups. On the other hand, BrdU⁺/Iba1⁺ cells have been found, indicating a contribution of the newborn cells in a microglial cell sub-population which could participate in phagocytosis of debris and dead cells of the injured cerebral parenchyma. Quantification of the cellular co-localization evaluated as a percentage of double positive cells confirmed the increase of BrdU⁺/Col IV⁺ cells in all treated groups, CR + LA, CR + BMDC and CR + BMDC + LA (*p* < 0.001), when compared to cryo-injured animals (CR). In addition, BrdU/Iba1 co-localization was statistically significant in the group treated separately with BMDC (CR + BMDC) (*p* < 0.01) and even higher in the group with combined therapy (CR + BMDC + LA) (*p* < 0.001) when compared with the cryo-injured group. A significant increase was found in the cellular co-localization between CR + BMDC + LA and CR + LA (*p* < 0.001), as well as between CR + BMDC + LA and CR + BMDC (*p* < 0.01). Finally, no significant differences were observed in the BrdU/GFAP double staining between any of the experimental groups (graph in Figure 4).

Presence of astrocytes after pharmacological and cellular treatment

After injury of the adult CNS, the main obstacle to axonal growth and neuronal regeneration is the formation of a scar tissue formed by reactive astrocytes and especially by intruding fibroblasts to the lesion site [21, 46, 47]. In order to evaluate the presence of astroglial sub-population,

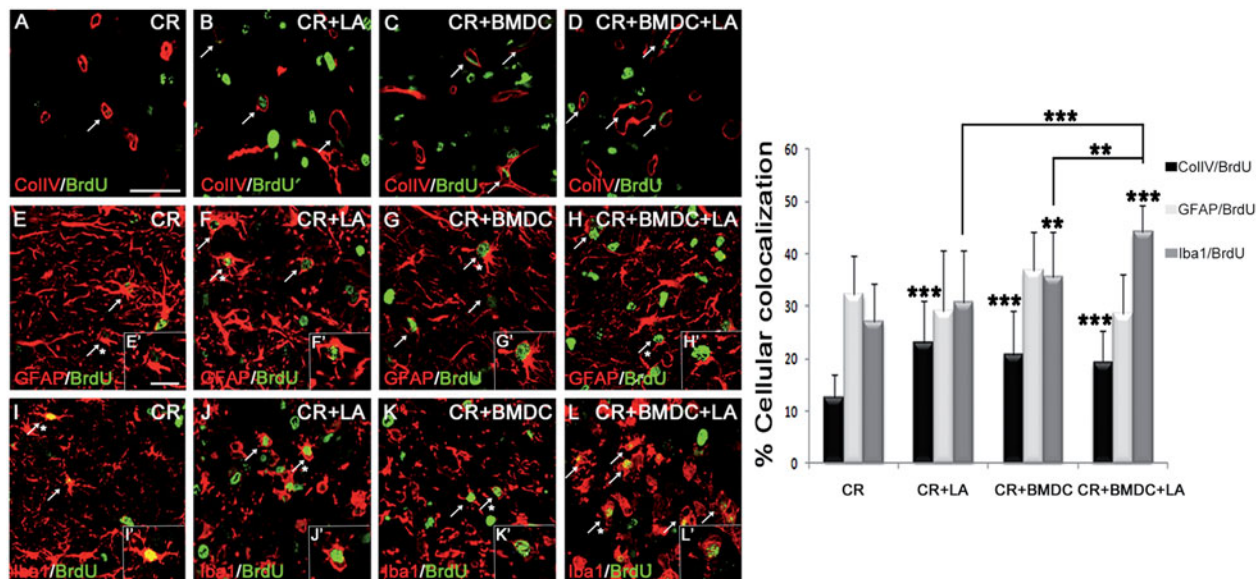


Figure 4. Molecular characterization of the new formed cells after pharmacological and cellular treatment in the lesioned area 8 days after cryo-injury. (A–D) Immunohistochemical co-localization of cryo-injured and LA-, BMDC- and BMDC + LA-treated animals for BrdU and typical endothelial marker Collagen IV, (E–H) typical astroglial marker GFAP and (I–L) typical microglial marker Iba1. Arrows indicate double-positive cells. (E–L') Magnified image of (E–L) corresponding to asterisk. The graph shows quantification within the injured area (% cellular co-localization) in each of the experimental groups. Scale bars: (A–I) 100 μ m; (E'–L') 50 μ m. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

this study performed immunostaining against specific astrocytic molecular marker GFAP. Administration of LA, BMDC or both resulted in a decrease of the glial scar surrounding the injured area 8 d.a.c. (Figure 5C–E). Furthermore, random distribution was observed of astroglia along the injured area, never concentrating in clusters of cells or forming glial scar, which prevents penetration of regenerating neuritis in the CNS lesion. Interestingly, in these animals sprouts of new formed tissue toward the CC (asterisks in Figure 5C–E) were also observed, suggesting a recovering mechanism by repopulation of the damaged area. On the other hand, the glial scar was present in the CR group (arrows in Figure 5B), clearly delimiting damaged tissue along the entire CC and, therefore, no extensions of sprouting tissue were observed.

In order to quantify astroglia, this study evaluated the percentage of the surface occupied by astrocytes in the 100 μ m strip from the injury limit 8 d.a.c. in all coronal sections presenting cryo-injury in experimental groups and in corresponding areas of the control group. A significant increase was observed in CR ($p < 0.05$), CR + BMDC ($p < 0.01$) and CR + BMDC + LA ($p < 0.05$) when compared to control animals. Moreover, this area was significantly bigger ($p < 0.01$) in the CR + LA group than in CR, CR + BMDC and CR + BMDC + LA (graph in Figure 5).

With a view to analyse development of the regenerating tissue sprouts and glial scar in treated and control animals, the same immunostaining assay was performed 16 d.a.c. Not only was there no observed late appearance of glial scar, but GFAP⁺ cells were localized inside the new formed neural parenchyma and a decrease of astroglia was observed among treated groups, suggesting reduction in acute glial activity (Figure 6C–E). Besides, GFAP⁺ cells were localized around blood vessels within the injured area wrapping around them, suggesting its supporting role in recovering BBB, in all three treated groups (arrowheads in Figure 6C–G). On the other

hand, glial scar persisted and seemed to be steadier in the CR group (arrows in Figure 6B), while a normal distribution of astrocytes was observed in the control group (Figure 6A).

Presence of microglia after pharmacological and cellular treatment

With a view to evaluate a microglial cell sub-population, immunostaining was performed against specific molecular marker Iba1 8 d.a.c. An increment of microglial cells was observed in the treated groups (Figure 7C–E) when compared with the non-treated groups (Figure 7A and B). Moreover, this increment has local character because Iba1⁺ cells were found only in the zone surrounding the injured area (Figure 7F, F', G and G').

In order to quantify microglia, the percentage of the surface occupied by Iba1⁺ cells was evaluated in all coronal sections presenting cryo-injury in the 100 μ m strip from the injury limit 8 d.a.c and a representative area in control animals. A significant increase was observed in CR + LA ($p < 0.01$), CR + BMDC and CR + BMDC + AL ($p < 0.001$) when compared to control animals. Moreover, this area was significantly bigger ($p < 0.001$) in CR + BMDC and CR + BMDC + LA groups compared to CR animals. This increment was even higher ($p < 0.05$, $p < 0.001$) in the CR + BMDC + LA group compared to CR + BMDC and to CR + LA, respectively. In addition, this data was significantly prominent ($p < 0.05$) in CR + BMDC when compared to CR + LA (graph in Figure 7).

With a prospect to analyse chronologic development of the active microglia in experimental groups, the same immunostaining assay was performed for Iba1 16 d.a.c. Apparently the same density of Iba1⁺ cells was shown in all treated groups and controls (Figure 8A and C–E), but an increment was observed with the cryo-injured group (Figure 8B). Moreover, an aggregation of microglial cells has not been found in the

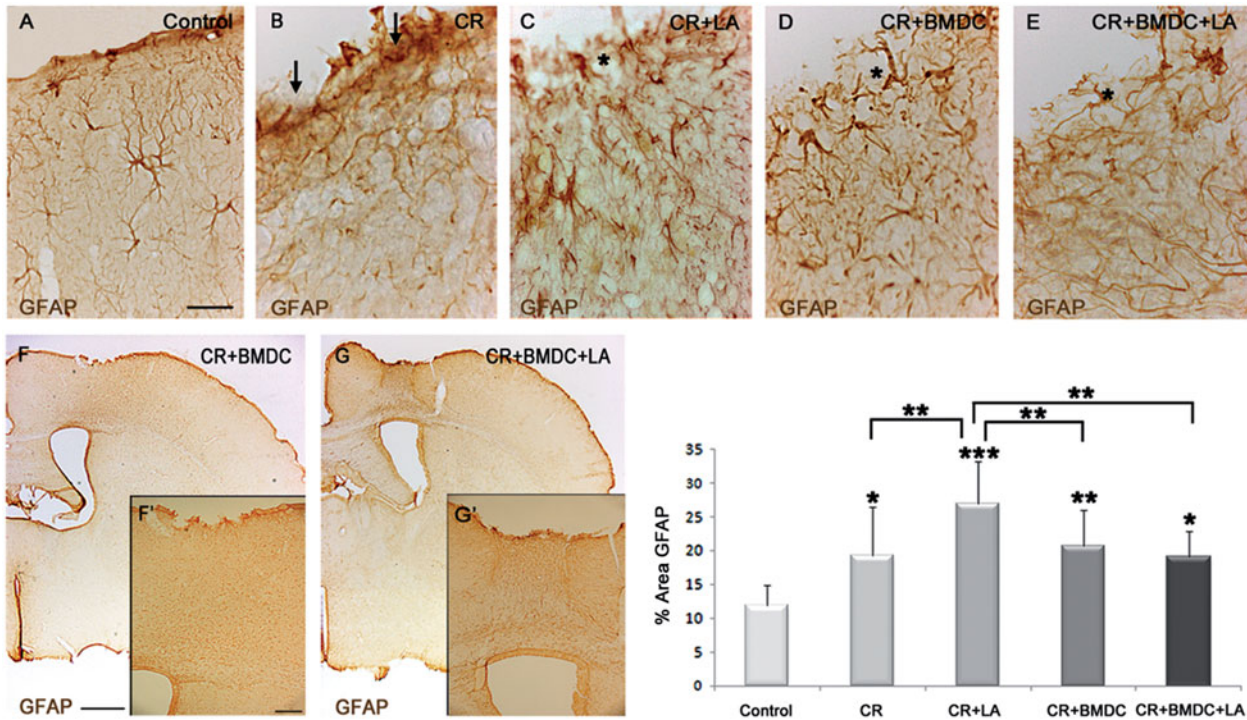


Figure 5. Presence of astrocytes after pharmacological and cellular treatment in the lesioned area 8 days after cryo-injury. (A–E) Micrographs of GFAP⁺ cells immunolabelled with DAB showing formation of glial scar barrier in cryo-injured no treated animal (arrows in b) and sprouts of new formed tissue toward the cystic cavity in all three treated groups (asterisk in C–E). (F and F') Larger panoramic view of the injured hemisphere of BMDC treated animal. (G and G') Larger panoramic view of the injured hemisphere of BMDC and LA-treated animal. The graph shows quantification of the first 100 μ m within the injured area occupied by astrocytes (% of GFAP area) in each of the experimental groups. Scale bars: (A–E) 10 μ m; (F and G) 500 μ m; (F' and G') 50 μ m. * p <0.05; ** p <0.01 and *** p <0.001.

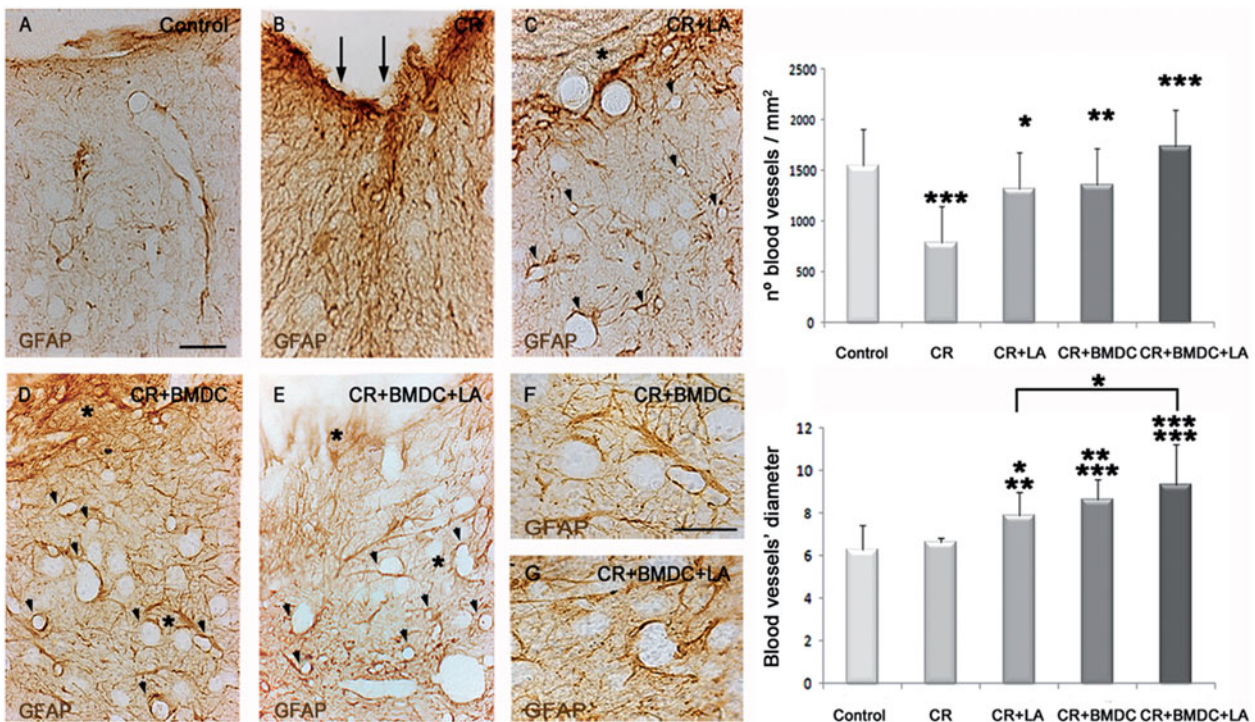


Figure 6. Presence of astrocytes after pharmacological and cellular treatment in the lesioned area 16 days after cryo-injury. (A–E) Micrographs of GFAP⁺ cells immunolabelled with DAB showing consolidation of the steady glial scar barrier in injured no treated animal (arrows in b) and sprouts of new formed tissue toward the cystic cavity in all three treated groups (asterisk in C–E). Note GFAP⁺ cells wrapping around blood vessels in all three treated groups (arrowheads in C–E). (F) Magnified image of (D) corresponding to asterisk. (G) Magnified image of (E) corresponding to asterisk. The graphs show quantification of n° blood vessels/mm² and blood vessels' diameter of the first 100 μ m within injured area. Scale bars: (A–G) 20 μ m. * p <0.05; ** p <0.01 and *** p <0.001.

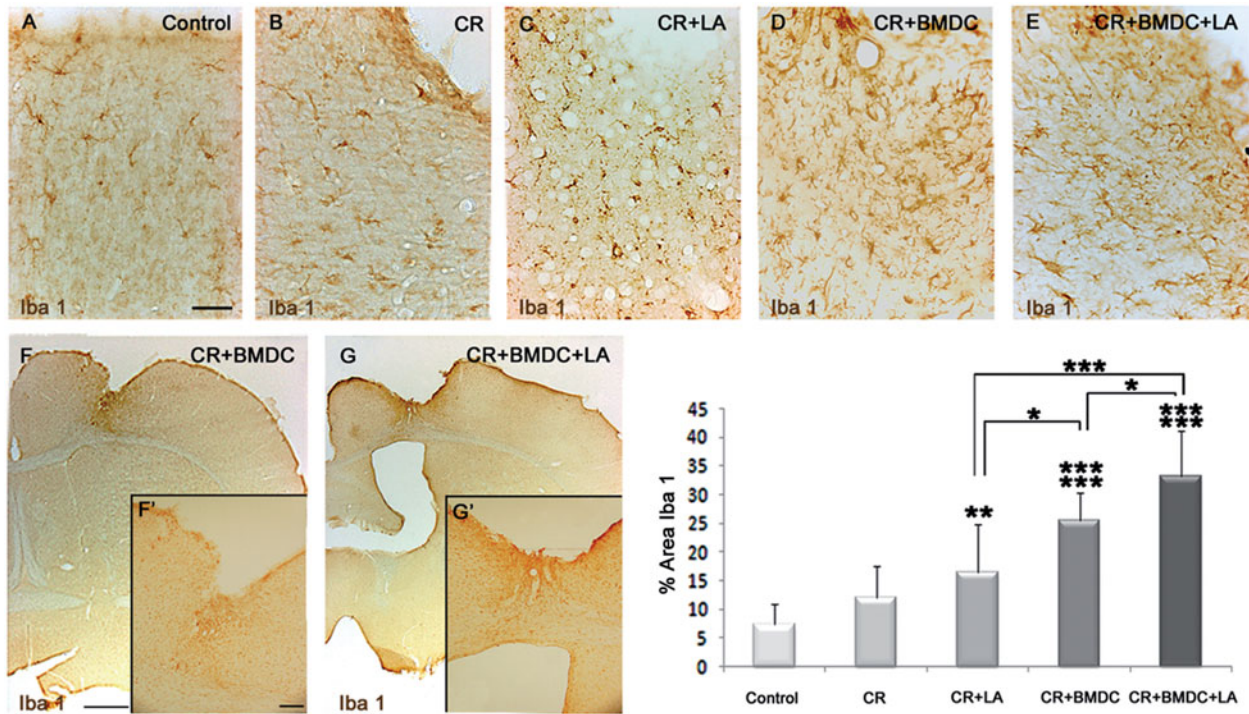


Figure 7. Presence of microglia after pharmacological and cellular treatment in the lesioned area 8 days after cryo-injury. (A–E) Micrographs of Iba1⁺ cells immunolabelled with DAB showing an increase in area occupied by microglia in treated animals. (F and F') Larger panoramic view of the injured hemisphere of BMDC treated animal. (G and G') Larger panoramic view of the injured hemisphere of BMDC and LA-treated animal. The graph shows quantification of the first 100 μm within the injured area occupied by microglia (% of Iba1 area) in each of the experimental groups. Scale bars: (A–E) 10 μm; (F and G) 500 μm; (F' and G') 50 μm. **p* < 0.05; ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001.

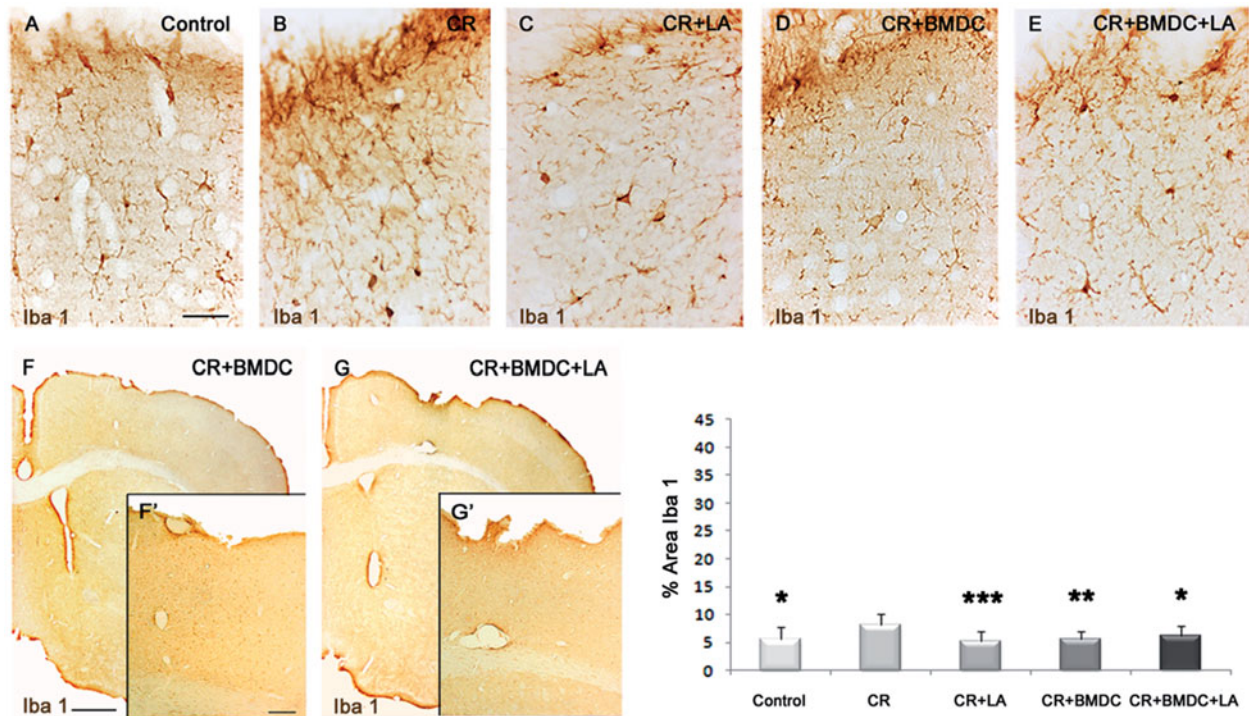


Figure 8. Presence of microglia after pharmacological and cellular treatment in the lesioned area 16 days after cryo-injury. (A–E) Micrographs of Iba1⁺ cells immunolabelled with DAB showing a decrease in area occupied by microglia in treated animals getting more or less the same level as control. (F and F') Larger panoramic view of the injured hemisphere of BMDC treated animal. (G and G') Larger panoramic view of the injured hemisphere of BMDC and LA-treated animal. The graph shows quantification of the first 100 μm within the injured area occupied by microglia (% of Iba1 area) in each of the experimental groups. Scale bars: (A–E) 10 μm; (F and G) 500 μm; (F' and G') 50 μm. **p* < 0.05; ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001.

zone adjacent to the injured area and the cells were distributed in a homogeneous way within the cortical parenchyma (Figure 8F, F', G and G'). In order to quantify microglia at this time point, the percentage of the surface occupied by microglia was evaluated in all coronal sections presenting cryo-injury in the 100 μm strip from the injury limit 16 d.a.c. and in the corresponding area of the control group. A significant decrease was observed in CR + LA ($p < 0.001$), CR + BMDC ($p < 0.01$), CR + BMDC + LA and control ($p < 0.05$) when compared to CR animals (graph in Figure 8).

Angiogenesis after pharmacological and cellular treatment

Consistent with the previous findings, the presence of blood vessels was evaluated. To achieve this aim, immunohistochemistry staining was performed for Collagen IV protein. In non-treated animals, the blood vessels presented an arbitrary distribution along the injured area (Figure 9A and B). Moreover, the arrangement of the blood vessels in treated animals was apparently parallel distributed with the sprouts oriented toward the CC and brain lesion (Figure 9C–E). Additionally, this parallel distribution remains in this way along the brain injury, not only concentrating adjacent to the CC (Figures 9F, F', G and G').

Furthermore, the amount and the diameter of the vessels in the treated animals seemed to be bigger. With the purpose to assess this issue, the area occupied by the blood vessels was quantified 8 d.a.c. (graph in Figure 9). Statistically relevant expansion of the area covered by blood vessels was observed

in treated groups compared with no treated animals. Specifically, a significant increase ($p < 0.01$) was observed in the LA treated group (CR + LA) and within the group with combined treatment (CR + BMDC + LA) in relation with control and cryo-injured group (Control and CR). Likewise, a significant increase ($p < 0.001$) of the BMDC treated animals compared with the control and CR groups was observed. Western blot for COL4A2 was done in order to verify the angiogenic effect of pharmacological and cellular treatment (Figure 10A). The quantification showed that administration of LA or BMDC treatment to CR + LA and CR + BMDC animals led to a significant increase ($p < 0.001$) of collagen levels compared with control and CR animals. Collagen levels were increased ($p < 0.05$) in combined treatment (CR + BMDC + LA) compared with control and CR animals (graph in Figure 10).

In order to explore characteristics of blood vessels 16 d.a.c., as a key factor in BBB restoration, the GFAP protein immunohistochemistry was employed followed by quantification of the number and diameter of these blood vessels. They were expressed as the total number of blood vessels referred to the total quantified area and as an average of blood vessels' diameter of all blood vessels within the first 100 μm from the injury limit, respectively. On the one hand, a significant decrease of the number of blood vessels was observed in the CR group ($p < 0.001$) when compared to control animals. Besides, a significant increase ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) has been shown in the groups treated separately with LA or BMDC (CR + LA and CR + BMDC, respectively) which was even higher ($p < 0.001$) in the group treated

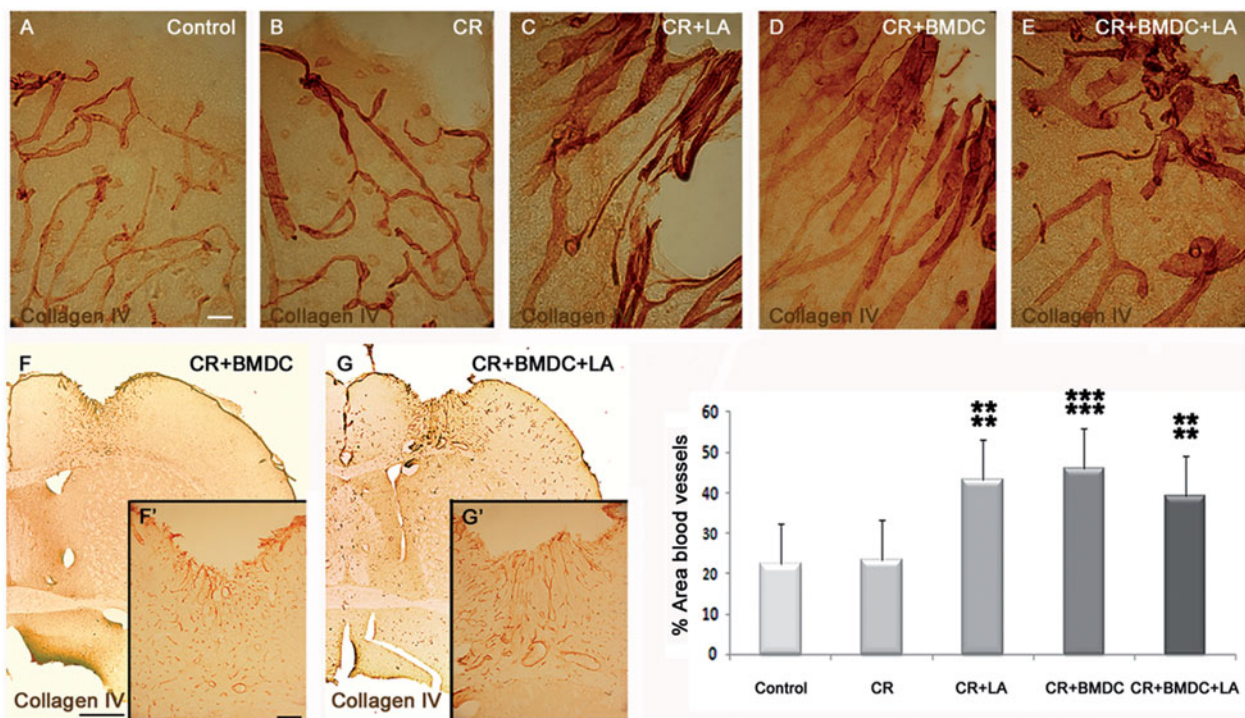
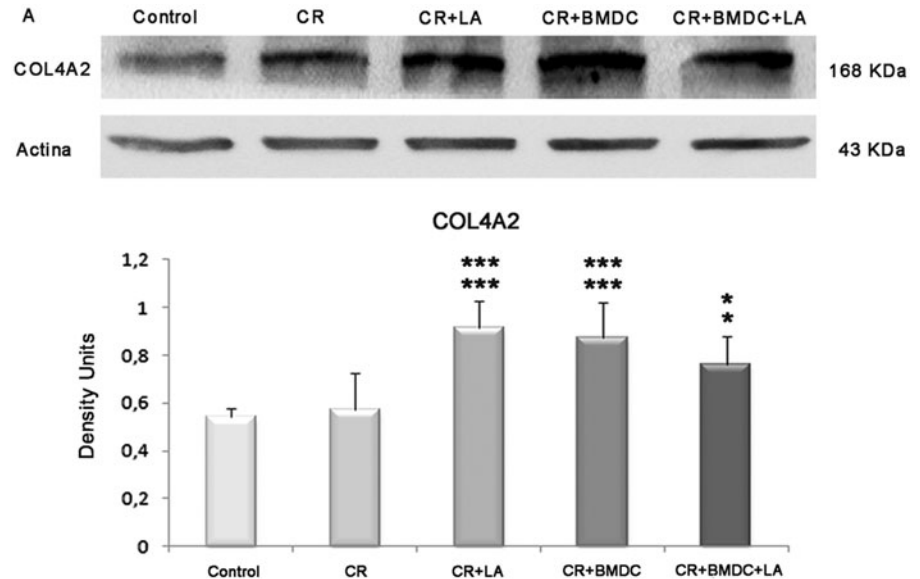


Figure 9. Angiogenesis after pharmacological and cellular treatment in the lesioned area 8 days after cryo-injury. (A–E) Micrographs of Collagen IV⁺ cells immunolabelled with DAB showing the presence and distribution of blood vessels exhibiting more organized arrangement in treated animals. Note the parallel orientation along the penumbra tissue toward the cystic cavity. (F and F') Larger panoramic view of the injured hemisphere of BMDC treated animal. (G and G') Larger panoramic view of the injured hemisphere of BMDC and LA-treated animal. The graph shows quantification of the area occupied by blood vessels (% of area Collagen IV⁺). Scale bars: (A–E) 10 μm ; (F and G) 500 μm ; (F' and G') 50 μm . ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 10. Presence of COL4A2 after pharmacological and cellular treatment in the lesioned area 8 days after cryo-injury. (A) Image of the western blot for COL4A2 protein for each experimental group showing an increase in the level of collagen in all treated animals. The graph demonstrates quantification of the densities of the bands (expressed as the ratio of COL4A2/Actina) in each of the experimental groups. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.



with combined therapy (CR + BMDC + LA) when compared with cryo-injured animals (CR). Moreover, the blood vessels' diameter was significantly increased in treated groups compared with no treated animals. Thus, a significant increase ($p < 0.01$) was observed of the LA treated group (CR+LA) compared with the control group. Likewise, a significant increase ($p < 0.001$) of the BMDC treated animals and the group treated with a combined approach compared with the control group was observed. In addition, the results showed here demonstrate a significant increase of blood vessels' diameter ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) in the group treated separately with LA or BMDC (CR + LA and CR + BMDC, respectively) which was even more significant ($p < 0.001$) in the group treated with combined therapy (CR + BMDC + LA) when compared with cryo-injured animals (CR). Moreover, this measure was significantly bigger ($p < 0.05$) in the CR + BMDC + LA group than in the CR + LA (graphs in Figure 6).

Discussion and conclusions

In this work it has been shown that intra-cerebral transplantation of BMDC and pharmacological treatment of LA stimulates proliferation and differentiation of the newborn cells toward astroglia, endothelial cells and microglia, suggesting their participation in the cortical parenchyma re-organization and angiogenesis 8 days after focal brain injury.

The present experimental model of focal injury (cryo-injury model in mice) has become extremely advantageous in comparison with other established models of diffuse TBI (e.g. fluid percussion, weight-drop models) [48–51] because the lesion here is clearly circumscribed, easily quantifiable and highly reproducible in size and location [5, 8, 9, 21, 52].

There are several studies that confirm the beneficial effect of LA in the treatment of many diseases such as diabetes, atherosclerosis, degenerative processes in neurons, diseases of joints or AIDS [53]. In animal models of TBI and stroke it is demonstrated that LA is able to restore BBB disruption and normalize the astrocytic/microglial activation [54–56]. Moreover, recent studies have shown the neuroprotective

effect of LA as an antioxidant and anti-inflammatory agent [57, 58], as well as its ability to regularize several genes involved in cell survival, inflammation and oxidative stress [59]. Previous studies demonstrated that LA promotes cell survival and proliferation in the focal injury area 15 days after brain injury, with a significant reduction of glial scar development and stimulation of angiogenic processes as a key restorative strategy in rehabilitation of the injured brain [21].

On the other hand, many authors have described the cell therapy potential for neuroregeneration and the tissue reconstruction after brain damage by using pluripotent cells. Thus, it has been shown that transplantation of MSC after brain or spinal cord injury involves a significant functional improvement. Likewise it has been described how the administration of autologous bone marrow stem cells (intracerebrally as well as intra-muscularly) in combination with a comprehensive rehabilitation programme produces functional improvements to incurable neurological diseases and injury in children [60]. In addition, the efficiency of intra-cerebral administration of multi-potent cells has been proved. In this sense, it has been shown that intra-cerebral transplantation of BMSC in an experimental model of brain infarct significantly enhanced functional recovery compared to intravenous administration of BMSC [43]. Furthermore and as a future purpose for clinical applications, bone marrow-derived cells become good candidates for cell therapy strategies, because they can be harvested from the patients themselves with no ethical or immunological difficulties [61–63]. Thus, a series of intra-cerebral BMDC grafts from GFP⁺ donors into the cortex of mouse previously lesioned by a focal cryo-injury was performed. In this model, transplanted cells disappeared progressively and virtually were not detected 16 d.a.c. This situation occurs in other similar studies, but at a later time point, where cells were still detected weeks or even months after transplantation [64, 65]. This discrepancy could be due to multiple aspects as the implemented animal model and type of cell used, the method and route of cell administration, the total number of transplanted cells and, more interestingly, the time point of cell transplantation. Cells were intentionally grafted on day 1 to anticipate severe second

damage mechanisms. However, it has been proposed that the hostile micro-environmental inflammatory conditions following injury may explain why the early transplanted cells promptly disappeared [66–71]. Nevertheless, the benefit and the tissular recovery have been evidenced to continue after donor cells are gone, showing that the limited permanence of transplanted cells had a positive effect, probably due to the modification of other host cells/factors [72]. Consistent with this notion, the present data coincides with previous studies showing a beneficial effect for brain injury regeneration in BMDC treated animals.

Previous studies have demonstrated that the pre-treating of cultured cells with growing factors increase the survival rate of BMDC after transplantation [36–38, 40, 42, 73]. In this case (isolation of BMDC from the adult mouse and no additional manipulation) one single cell injection in the right hemisphere was able to cover a wide area of the injured adult brain and no gross morphological alterations due to the route of administration were observed. However, in the control group (with no cryo-injury), migration was confined to the limited area surrounding the injection site and/or superficial zone. Additionally, BMDC were not distributed homogeneously across the brain tissue, but rather formatted several cellular aggregations. In contrast, these clusters of GFP⁺ cells have not been observed in cryo-injured groups, probably due to the intensively ‘active’ repair processes in the penumbra zone which stimulate cell migration and re-organization [11]. All of these endogenous repair processes (plasticity, neurogenesis and angiogenesis) occur in an adult brain as a response to focal brain injury, but it has been demonstrated that repairing processes could also be stimulated by additional cellular therapy [74].

Nevertheless, this study has not found statistical differences in the number of transplanted BMDC between treated (CR + BMDC and CR + BMDC + LA) and control (Control + BMDC) groups 8 d.a.c. These intra-cerebrally transplanted BMDC have been broadly distributed in the cortex of all cryo-injured mice, covering the penumbra tissue surrounding a focal cerebral injury. Although there was a tendency in increase of the number of GFP⁺ cells in cryo-injured animals compared to controls, statistically the same number of transplanted BMDC present between control and cryo-injured groups can be explained in consequence of over-estimation of a total number of GFP⁺ cells due to the above-mentioned self-aggregation and cluster formation.

Another important consequence after combined treatment with LA and BMDC is the proliferation rate within the injured zone. As has been shown there is an evident increase of BrdU labelled cells when the injured animals were treated with LA and with LA + BMDC 8 d.a.c. However, it is hypothesized that the cells responsible for the regeneration (BrdU⁺) of injured area were not the transplanted BMDC since they decrease in number and completely disappeared after 16 days. In contrast, endothelial cells, astrocytes and microglia labelled with BrdU persisted and showed a normal morphology and staining patterns, suggesting a reconstruction of the damaged area. The highest proliferative rate was observed in the animal group with combined cell and antioxidant therapy (CR + BMDC + LA), although the same number of transplanted BMDC was present between control and cryo-

injured groups. This data suggest that grafted BMDC could help to enhance local endogenous proliferation and probably stimulate proliferation and subsequent migration from surrounding zones. Thus, considering that these newborn cells presented phenotype of glial and blood vessel cells, it was decided to analyse glial and angiogenic response in this zone. This study evaluates the formation of the glial scar (major impediment to regeneration in damaged CNS) and, as shown in the results, there was a reduction in the glial scar in all treated groups 8 d.a.c. when compared to the animals that did not receive cell or/and antioxidant administration. Besides, this glial scar is even more emphasized in non-treated animals 16 d.a.c. while treated animals never showed formation of a steady glial scar. Interestingly, at this time point no GFP⁺ cells were detectable in grafted brains, which suggest that the reconstruction of the new tissue was carried on by new cells from the host brain. On the other hand, the evaluated effect on the glia organization was observed once the transplanted cells had disappeared, suggesting that this curative effect was a consequence of a previous activity and stimulation by the grafted cells as other authors published in similar studies [34, 71, 72, 75].

Another interesting point is that the absent of a glial scar after BMDC and BMDC + LA treatments allows the presence of new cells (BrdU⁺) like microglial cells, which could be involved in remodelling processes [21]. Accordingly, other studies have demonstrated that the systemic administration of MSC after experimental stroke increased activated microglia and astrocytes and also enhanced the cytokines/growth factors secretion, which play an important role in a neuroprotective and/or neuroregenerative response in the host organism [72]. The present work has reported an increment of microglia cells in all cryo-injured groups 8 d.a.c., this increment being significantly higher in animals treated with bone marrow grafts (CR + BMDC and CR + BMDC + LA). Nevertheless, one cannot declare whether this microglia comes from transplanted BMDCs, from brain resident microglia or from both. These findings are concurrent with other similar studies where it has been shown that, after injury, the innate immune system initiates an invasion or infiltration of microglia/macrophages and tissue-resident innate immune cells [76–80]. The result showed this increment in the microglia number (Figure 7,) but it was not correlated with an increment in inflammatory markers such as TNF α (data not shown).

An important aspect to consider is whether neuroplasticity stimulation could be favoured by microglia-mediated BDNF production [81, 82], which has been shown to act as a neuroprotective agent [83, 84]. Interestingly, a significant increment in the levels of BDNF in all treated groups has been observed (data not shown).

However, in order to evaluate the time course of the microglial presence after pharmacological and cellular treatments, the same analysis was performed at 16 d.a.c. It was found that this microglial sub-population statistically decreased in all treated groups compared to its levels at 8 d.a.c. (Figure 11), suggesting that this primary increase of microglia cells in treated groups could be beneficial for removal of tissue debris, a very important function toward a pro-regenerative environment within the CNS [85–90].

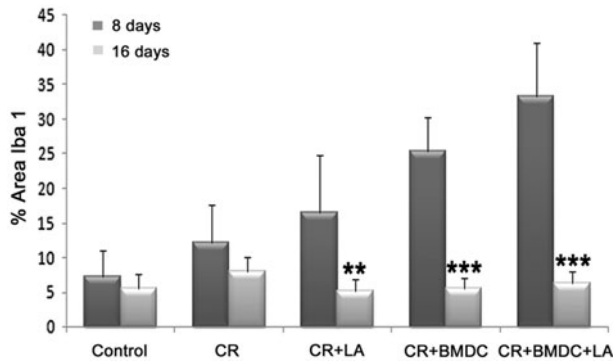


Figure 11. Statistical comparison of the measurement of Iba1 positive cells after pharmacological and cellular treatment in the lesioned area 8 and 16 days after cryo-injury. The graph shows quantification of the area occupied by microglia within the injured area (% of Iba1 area) in each of the experimental groups, showing a statistical decrease in the treated groups 16 d.a.c. when compared with the same groups 8 d.a.c. $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$.

Over several decades there have been controversial roles of microglia in CNS injury (harmful or beneficial), because on the one hand it has been suggested that activated microglia cells produce neurotoxins, reactive oxygen species, toxic prostanoids and contribute to excitotoxicity [91–94]. However, in other recent studies there has been indicated that both microglia and macrophages can play contrasting roles after injury by modulating both the inflammatory/immune responses and decreasing apoptosis and for this reason may also be beneficial for neurogenesis.

Another essential point concerning recovery therapy after focal brain injury is the angiogenesis, which seems to be stimulated and accelerated by treatment with antioxidant and neuroprotective factors after brain damage [21, 95, 96]. It is important to remark that angiogenesis is directly related to neurogenesis and neuroregeneration since blood supply is necessary for new neuronal survival and development [97, 98]. In a previous study, it was observed that LA was able to stimulate angiogenesis after brain injury. It has also been demonstrated that LA was capable of stimulating angiogenesis itself, in spite of VEGF being previously blocking [21]. In the same line, the potential of BMDC to promote angiogenesis [39, 73, 99] is well known and there have even been reports that bone marrow cells secrete multiple supporting trophic factors with angiogenic properties [100].

In the present study, it has been observed that both treatments LA or BMDC were able to stimulate angiogenesis. Besides, the combination of both treatments (BMDC + LA) even promoted angiogenesis after focal injury. When all treatments were compared, no statistically significant difference were seen (in terms of area occupied by blood vessels, number of blood vessels or collagen levels). Nonetheless, when analysing the diameter of the blood vessels at 16 d.a.c., it was observed that they were bigger in those animals treated with BMDC + LA compared with the LA treated animals, suggesting that the treatment could affect the endothelial cell disposition during blood vessels formation.

It is important to remark on the orientation of new blood vessels after treatments. The orientation of the newly formed blood vessels towards the injured area was consistent with the recent findings obtained by this group in which LA treatment

promotes angiogenesis towards the injury [21]. It could also be in relation to other results in which blood vessels seem to play a role as a scaffold for migrating neural progenitor cells toward the damaged brain region [101]. Besides it being very well known that brain endothelial cells play an important role in the re-organization and reconstruction of the injured brain parenchyma, also the presence and the astrocytes contact with the cerebrovascular endothelium is necessary for the reconstruction of the new BBB, to ensure a correct local reperfusion [5, 102]. In this sense, the cell organization of differentiated astrocytes surrounding the new blood vessels after treatments with LA [21] and also with BMDC and BMDC + LA (Figure 6) were observed, suggesting a regeneration and maturation of the new cortical tissue after focal injury. Angiogenic activity is crucial for efficient recovery after focal brain injuries, as it has been shown in mouse and rat models where animals with a higher cerebral blood vessel density make better progress and survive longer than those with lower vascular density [30, 82].

In conclusion, the results demonstrate that transplantation of BMDC is a good and valid alternative strategy to treat a focal brain injury. Besides, the BMDC treatment has similar effects to the LA treatments in terms of angiogenesis, cell proliferation and glial scar formation. Nonetheless, the BMDC treatment is a local single treatment that could reduce the systemic and non-desired secondary effects mediated by LA. In this sense, BMDC could be an alternative treatment when LA could not be prescribed.

These results demonstrated that synergic effects were circumscribed to an increase of proliferation and microglia number in the treated area.

Acknowledgements

JMSL acknowledges funding through Programa de Ayudas a la Investigación Científica Ramón Areces (2009). Programa de Ayudas a la Investigación Universidad CEU-Cardenal Herrera (PRCEU-UCH 34/12) Grupos consolidados. MAGE acknowledges funding through Programa de Ayudas a la Investigación a grupos competitivos Universidad CEU-Cardenal Herrera (PRCEU-UCH/12). FBM acknowledges funding through Copérnicus-Santander (PRCEU-UCH/COP/12). IZ acknowledges funding through Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad CEU Cardenal Herrera.AI/ICB Santander 11/12. (Ayudas a gruposprecompetitivos). We thank Cristina Llinares for help and support with histology studies and statistical analysis.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

1. Maegele M, Schaefer U. Stem cell-based cellular replacement strategies following traumatic brain injury (TBI). *Minimally Invasive Therapy & Allied Technology* 2008;17:119–131.
2. Reilly P. The impact of neurotrauma on society: An international perspective. *Progress in Brain Research* 2007;161:3–9.

3. Hyder AA, Wunderlich CA, Puvanachandra P, Gururaj G, Kobusingye OC. The impact of traumatic brain injuries: A global perspective. *NeuroRehabilitation* 2007;22:341–353.
4. Rossnagel K, Nolte C, Muller-Nordorn J, Junfehusing G, Selim D, Bruggenjurgen B. Medical resource use and costs of health care after acute stroke in Germany. *European Journal of Neurology* 2005;11:862–868.
5. Cederberg D, Siesjo P. What has inflammation to do with traumatic brain injury? *Childs Nervous System* 2010;26:221–226.
6. DeKosky ST, Kochanek PM, Clark RS, Ciallella JR, Dixon CE. Secondary injury after head trauma: Subacute and long-term mechanisms. *Seminars in Clinical Neuropsychiatry* 1998;3: 176–185.
7. McIntosh TK, Smith DH, Meaney DF, Kotapka MJ, Gennarelli TA, Graham DI. Neuropathological sequelae of traumatic brain injury: Relationship to neurochemical and biomechanical mechanisms. *Laboratory Investigation* 1996;74:315–342.
8. Raslan F, Albert-Weissenberger C, Ernestus RI, Kleinschnitz C, Siren AL. Focal brain trauma in the cryogenic lesion model in mice. *Experimental & Translational Stroke Medicine* 2012;4:6–10.
9. Sauerbeck A, Gao J, Readnower R, Liu M, Pauly JR, Bing G, Sullivan PG. Pioglitazone attenuates mitochondrial dysfunction, cognitive impairment, cortical tissue loss, and inflammation following traumatic brain injury. *Experimental Neurology* 2011; 227:128–135.
10. Plesnila N, Friedrich D, Eriskat J, Baethmann A, Stoffel M. Relative cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical lesion in rats. *Neuroscience Letters* 2003;345:85–88.
11. Touzani O, Roussel S, MacKenzie ET. The ischaemic penumbra. *Current Opinion in Neurology* 2001;14:83–88.
12. Chesnut RM. Secondary brain insults after head injury: Clinical perspectives. *New Horizons* 1995;3:366–375.
13. Jeremitsky E, Omert L, Dunham CM, Protetch J, Rodriguez A. Harbingers of poor outcome the day after severe brain injury: Hypothermia, hypoxia, and hypoperfusion. *Journal of Trauma* 2003;54:312–319.
14. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience* 2004;129:1021–1029.
15. Davenport R, Dennis M. Neurological emergencies: Acute stroke. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2000;68: 277–288.
16. Harting MT, Baumgartner JE, Worth LL, Ewing-Cobbs L, Gee AP, Day MC, Cox Jr CS. Cell therapies for traumatic brain injury. *Neurosurgical Focus* 2008;24:E18–39.
17. Vannucci RC, Perlman JM. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1997;100:1004–1014.
18. Toliaas CM, Bullock MR. Critical appraisal of neuroprotection trials in head injury: What have we learned? *NeuroRx* 2004;1:71–79.
19. Marklund N, Bakshi A, Castelbuono D, Conte V, McIntosh TK. Evaluation of pharmacological treatment strategies in traumatic brain injury. *Current Pharmaceutical Design* 2006;12:1645–1680.
20. Goraca A, Huk-Kolega H, Piechota A, Kleniewska P, Ciejka E, Skibka B. Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential. *Pharmacological Reports* 2011;63:849–858.
21. Rocamonde B, Paradells S, Barcia JM, Barcia C, Garcia Verdugo JM, Miranda M, Romero Gomez FJ, Soria JM. Neuroprotection of lipoic acid treatment promotes angiogenesis and reduces the glial scar formation after brain injury. *Neuroscience* 2012;224:102–115.
22. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature Medicine* 2002;8:963–970.
23. Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nature Neuroscience* 2000;3:537–544.
24. Satoshi K, Hideo S, Kiyohiro H, Yoshinobu I. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for central nervous system disorders- Recent progress and perspective for clinical application. *Journal of Stem Cells and Regenerative Medicine* 2011;7:2–13.
25. Savitz SI, Fisher M. Future of neuroprotection for acute stroke: In the aftermath of the SAINT trials. *Annals of Neurology* 2007;61: 396–402.
26. Beck H, Voswinkel R, Wagner S, Ziegelhoeffer T, Heil M, Helisch A, Schaper W, Acker T, Hatzopoulos AK, Plate KH. Participation of bone marrow-derived cells in long-term repair processes after experimental stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2003;23:709–717.
27. Hess DC, Abe T, Hill WD, Studdard AM, Carothers J, Masuya M, Fleming PA, Drake CJ, Ogawa M. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Experimental Neurology* 2004;186:134–144.
28. Priller J, Flugel A, Wehner T, Boentert M, Hass C, Prinz M, Fernandez-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer B, et al. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nature Medicine* 2001;7:1356–1361.
29. Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, Carroll J, Brailer J, Carothers J. Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke. *Stroke* 2002;33:1362–1368.
30. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circulation Research* 2002;90:284–288.
31. Eglitis MA, Dawson D, Park KW, Mouradian MM. Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. *Neuroreport* 1999; 10:1289–1292.
32. Cogle CR, Yachnis AT, Laywell ED, Zander DS, Wingard JR, Steindler DA, Scott EW. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: A retrospective study. *Lancet* 2004;363: 1432–1437.
33. Kokovay E, Li L, Cunningham LA. Angiogenic recruitment of pericytes from bone marrow after stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2006;26:545–555.
34. Tate CC, Case CC, editors. *Mesenchymal stromal cells to treat brain injury, advanced topics in neurological disorders*. Mountain View, CA: SanBio, Inc.; 2012.
35. Kuhn HG, Palmer TD, Fuchs E. Adult neurogenesis: A compensatory mechanism for neuronal damage. *European Archives of Psychiatry Clinical Neuroscience* 2001;251:152–158.
36. Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *Journal of Neuroscience* 1997;17:5820–5829.
37. Pencea V, Bingaman K, Wiegand S, Luskin M. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *Journal of Neuroscience* 2001;21: 6706–6717.
38. Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Chopp M. Caspase inhibition by Z-VAD increases the survival of grafted bone marrow cells and improves functional outcomes after MCAo in rats. *Journal of Neurological Sciences* 2002;199:17–24.
39. Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, Lu M, Gautam SC, Chopp M. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *Journal of Neuroscience Research* 2003;73:778–786.
40. Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Katakowski M, Zhang LJ, Lu M, Janakiraman N, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: Neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 2002;59:514–523.
41. Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, Lu M, Gautam S, Chopp M. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promote endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *Journal of Neuroscience Research* 2003;73: 778–786.
42. Zhang J, Li Y, Chen J, Yang M, Katakowski M, Lu M, Chopp M. Expression of insulin-like growth factor 1 and receptor in ischemic rats treated with human marrow stromal cells. *Brain Research* 2004; 1030:19–27.
43. Kawabori M, Kuroda S, Suqiyama T, Ito M, Shichinohe H, Houkin K, Kuge Y, Tamaki N. Intracerebral, but not intravenous, transplantation of bone marrow stromal cells enhances functional recovery in rat cerebral infarct: An optical imaging study. *Neuropathology* 2012;32:217–226.
44. Quintana A, Giral M, Molinero A, Campbell IL, Penkowa M, Hidalgo J. Analysis of the cerebral transcriptome in mice subjected to traumatic brain injury: Importance of IL-6. *Neuroimmunomodulation* 2007;14:139–143.
45. Paxinos G, Franklin KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Academic Press; 2004.

46. Kawano H, Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Yoshioka N, Li HP, Kawamura K, Li Y, Raisman G. Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell and Tissue Research* 2012;349:169–180.
47. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews Neuroscience* 2004;5:146–156.
48. Klatzo I, Piraux A, Laskowsky EJ. The relationship between edema, blood brain barrier and tissue elements in a local brain injury. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 1958;17:548–564.
49. Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. Responses to cortical injury. I: Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Research* 1981;211:67–77.
50. McIntosh TK, Vink R, Noble L, Yamakami I, Fernyak S, Soares H, Faden AL. Traumatic brain injury in the rat: Characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience* 1989;28:233–244.
51. Cernak I. Animal models of head trauma. *NeuroRx* 2005;2:410–422.
52. Siren AL, Radyushkin K, Boretius S, Kammer D, Riechers CC, Natt O, Sargin D, Watanabe T, Sperling S, Michaelis T, et al. Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin. *Brain* 2006;129:480–489.
53. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine* 1995;19:227–250.
54. Gonzalez-Perez O, Gonzalez-Castaneda RE, Huerta M, Luquin S, Gómez-Pinedo U, Sanchez-Almaraz E, Navarro-Ruiz A, Garcia-Estrada J. Beneficial effects of alpha-lipoic acid plus vitamin E on neurological deficit, reactive gliosis and neuronal remodeling in the penumbra of the ischemic rat brain. *Neuroscience Letters* 2002;321:100–104.
55. Schreibelt G, Musters RJ, Reijerkerk A, de Groot LR, Van der Pol SM, Hendriks EM, Dopp ED, Dijkstra CD, Drukarch B, de Vries HE. Lipoic acid affects cellular migration into the central nervous system and stabilizes blood-brain barrier integrity. *Journal of Immunology* 2006;177:2630–2637.
56. Toklu HZ, Hakan T, Biber N, Solakoglu S, Ogunc AV, Sener G. The protective effect of alpha lipoic acid against traumatic brain injury in rats. *Free Radical Research* 2009;43:658–667.
57. Freitas RM. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. *Neuroscience Letters* 2009;455:140–144.
58. Toklu HZ, Hakan T, Biber N, Solakoglu S, Ogunc AV, Sener G. The protective effect of alpha lipoic acid against traumatic brain injury in rats. *Free Radical Research* 2009;43:658–667.
59. Larghero P, Vene R, Minghelli S, Travaini G, Morini M, Ferrari N, Pfeffer U, Noonan DM, Albin A, Benelli R. Biological assays and genomic analysis reveal lipoic acid modulation of endothelial cell behavior and gene expression. *Carcinogenesis* 2007;28:1008–1020.
60. Sharma A, Gokulchandran N, Chopra G, Kulkarni P, Lohia M, Badhe P, Jacob VC. Administration of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in children with incurable neurological disorders and injury is safe and improves their quality of life. *Cell Transplantation* 2012;21:S79–S90.
61. Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 2007;38:817–826.
62. Parr AM, Tator CH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:609–619.
63. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998;95:3908–3913.
64. Maruichi K, Kuroda S, Chiba Y, Hokari M, Shichinohe H, Hida K, Iwasaki Y. Transplanted bone marrow stromal cells improves cognitive dysfunction due to diffuse axonal injury in rats. *Neuropathology* 2009;29:422–432.
65. Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Chopp M. Long-term recovery after bone marrow stromal cell treatment of traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurosurgery* 2006;104:272–277.
66. Li Y, Chen J, Chopp M. Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. *Cell Transplant* 2001;10:31–40.
67. Shen LH, Li Y, Chen J, Cui Y, Zhang C, Kapke A, Lu M, Savant-Bhonsale S, Chopp M. One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke. *Stroke* 2007;38:2150–2156.
68. Li Y, Chen J, Wang L, Lu M, Chopp M. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology* 2001b;56:1666–1672.
69. Shen LH, Li Y, Chen J, Zacharek A, Gao Q, Kapke A, Lu M, Raginski K, Vanguri P, Smith A, et al. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2007;27:6–13.
70. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene C, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurobiological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Experimental Neurology* 2002;174:11–20.
71. Mora-Lee S, Sirerol-Piquer MS, Gutierrez-Perez M, Gomez-Pinedo U, Roobrouck VD, Lopez T, Casado-Nieto M, Abizanda G, Rabena MT, Verfaillie C, et al. Therapeutic effects of hMAPC and hMSC transplantation after stroke in mice. *PLoS One* 2012;7:e43683.
72. Yang M, Wei X, Li J, Heine LA, Rosenwasser R, Iacovitti L. Changes in host blood factors and brain glia accompanying the functional recovery after systemic administration of bone marrow stem cells in ischemic stroke rats. *Cell Transplant* 2010;19:1073–1084.
73. Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, Xu YX, Gautam SC, Lu M, Zhu Z, Chopp M. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circulation Research* 2003;92:692–699.
74. Font MA, Arboix A, Krupinski J. Angiogenesis, neurogenesis and neuroplasticity in ischemic stroke. *Current Cardiology Reviews* 2010;6:238–244.
75. Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, Spees JL, Prockop DJ. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 2005;102:18171–18176.
76. Perry VH, Bell MD, Brown HC, Matyszak MK. Inflammation in the nervous system. *Current Opinion in Neurology* 1995;5:636–641.
77. Glezer I, Rivest S. Glucocorticoids: Protectors of the brain during innate immune responses. *Neuroscientist* 2004;10:538–552.
78. Giulian D. Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *Journal of Neuroscience Research* 1987;18:155–171, 132–133.
79. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nature Neuroscience* 2005;8:752–758.
80. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science* 2005;308:1314–1318.
81. Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 2004;22:123–131.
82. Lipsky RH, Marini AM. Brain-derived neurotrophic factor in neuronal survival and behavior-related plasticity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007;1122:130–143.
83. Wu D. Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins. *NeuroRx* 2005;2:120–128.
84. Schabitz WR, Schwab S, Spranger M, Hacke W. Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1997;17:500–506.
85. Bonde S, Ekdahl CT, Lindvall O. Long-term neuronal replacement in adult rat hippocampus after status epilepticus despite chronic inflammation. *European Journal of Neuroscience* 2006;23:965–974.
86. Mariotto S, Suzuki Y, Persichini T, Colasanti M, Suzuki H, Cantoni O. Cross-talk between NO and arachidonic acid in inflammation. *Current Medicinal Chemistry* 2007;14:1940–1944.
87. Brown GC. Mechanism of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochemical Society Transactions* 2007;35:1119–1121.
88. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *Journal of Neuroimmunology* 2007;184:53–68.
89. Ohtaki H, Ylostalo JH, Foraker JE, Robinson AP, Reger RL, Shioda S, Prockop DJ. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 2008;105:14638–14643.

90. Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkel D, Hanish U, Mack M, Heikenwalder M, Brück W, Priller J, Prinz M. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+monocytes only under defined host conditions. *Nature Neuroscience* 2007;10:1544–1553.
91. Cinelli P, Madani R, Tsuzuki N, Vallet P, Arras M, Zhao C, Osterwalder T, Rulicke T, Sonderegger P. Neuroserpin, a neuroprotective factor in focal ischemic stroke. *Molecular & Cellular Neuroscience* 2001;18:443–457.
92. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz M. Pathobiology of ischemic stroke: An integrated view. *Trends in Neuroscience* 1999;22:391–397.
93. Kim W, Mohny R, Wilson B, Jeohn G, Liu B, Hong J. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: Role of microglia. *Journal of Neuroscience* 2000;20:6309–6316.
94. Tikka TM, Koistinaho JE. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *Journal of Immunology* 2001;166:7527–7533.
95. Dong W, Li N, Gao D, Zhen H, Zhang X, Li F. Resveratrol attenuates ischemic brain damage in the delayed phase after stroke and induces messenger RNA and protein express for angiogenic factors. *Journal of Vascular Surgery* 2008;48:709–714.
96. Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Leker RR. Combination of vascular endothelial and fibroblast growth factor 2 for induction of neurogenesis and angiogenesis after traumatic brain injury. *Journal of Molecular Neuroscience* 2012;47:166–172.
97. Slevin M, Kumar P, Gaffney J, Kumar S, Krupinski J. Can angiogenesis be exploited to improve stroke outcome? Mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science (London)* 2006;111:171–183.
98. Lizasoain I, Moro MA, Fernández-López D, Pradillo JM, Sobrino T, Castillo J. Plasticidad, neurogénesis y angiogénesis. 2007. *Fisiopatología de la isquemia cerebral*. Barcelona (España).
99. Guo F, Lv S, Lou Y, Tu W, Liao W, Wang Y, Deng Z. Bone marrow stromal cells enhance the angiogenesis in ischaemic cortex after stroke: Involvement of notch signalling. *Cell Biology International* 2012;36:997–1004.
100. Ashwell KW, Hardman C, Paxinos G. The claustrum is not missing from all monotreme brains. *Brain, Behavior & Evolution* 2004;64:223–141.
101. Kojima T, Hirota Y, Ema M, Takahashi S, Miyoshi I, Okano H, Sawamoto K. Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells* 2010;28:545–554.
102. Capilla-Gonzalez V, Gil-Perotin S, Garcia-Verdugo JM. Postnatal exposure to N-ethyl-N-nitrosurea disrupts the subventricular zone in adult rodents. *European Journal of Neuroscience* 2010;32:1789–1799.

