

Modelos *in vitro* de isquemia cerebral

In vitro models of cerebral ischemia

Amanda Elisa Moya Gómez^{1,3*} <https://orcid.org/0000-0002-0766-6249>

Lena Pérez Font² <https://orcid.org/0000-0002-2957-8653>

Annelies Bronckaers³ <https://orcid.org/0000-0001-8969-873X>

¹Universidad de Oriente, Facultad de Ingeniería en Informática, Telecomunicaciones y Biomédica (FITIB). Santiago de Cuba, Cuba.

²Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA). Santiago de Cuba, Cuba.

³Universidad de Hasselt. Instituto BIOMED. Hasselt, Bélgica.

* Autor para la correspondencia: aemoya@uo.edu.cu

RESUMEN

Introducción: La isquemia cerebral constituye una de las primeras causas de muerte y la principal causa de discapacidad adquirida a nivel mundial. Actualmente se estudian nuevas variantes terapéuticas mediante la comprobación de su efecto neuroprotector o neuroreparador; para ello se utilizan los modelos *in vitro* que permiten entender la fisiopatología, y los mecanismos moleculares y celulares involucrados.

Objetivo: Describir la actualidad de los modelos *in vitro* de isquemia cerebral.

Método: Se realizó una revisión sistemática de los modelos *in vitro* de isquemia cerebral utilizados en los últimos cinco años. Se tuvieron en cuenta los procesos de la cascada isquémica simulada, el tipo celular y los indicadores isquémicos.

Conclusión: Se pueden definir varios tipos de modelos *in vitro*: los de privación de oxígeno y glucosa, que simulan el proceso isquémico desde su

punto inicial, y los que reflejan procesos más específicos como los de excitotoxicidad, estrés oxidativo e inflamación. En todos los modelos se utilizan células primarias gliales, epiteliales o neuronales y se obtienen indicadores isquémicos que varían desde el aumento de citocinas proinflamatorias a la pérdida de la viabilidad celular.

Palabras claves: isquemia cerebral; modelos *in vitro*; glutamato; OGD; inflamación; peróxido de hidrógeno.

ABSTRACT

Introduction: Cerebral ischemia constitutes one of the first causes of death and the main cause of acquired disability worldwide. New therapeutic variants are currently being studied by testing their neuroprotective or neuroreparative effect; for this purpose, *in vitro* models are used to understand the pathophysiology, and the molecular and cellular mechanisms involved.

Objective: To describe the up-to-date *in vitro* models of cerebral ischemia.

Methods: A systematic review of *in vitro* models of cerebral ischemia used in the last five years was carried out. The processes of the simulated ischemic cascade, cell type and ischemic indicators were taken into account.

Conclusions: Several types of *in vitro* models can be defined, those of oxygen and glucose deprivation, which simulate the ischemic process from its initial point, and those that reflect more specific processes such as excitotoxicity, oxidative stress and inflammation. In all models, primary glial, epithelial or neuronal cells are used and ischemic indicators ranging from increased proinflammatory cytokines to loss of cell viability are obtained.

Keywords: cerebral ischemia; *in vitro* models; glutamate; OGD; inflammation; hydrogen peroxide.

Recibido: 16/10/2020

Aceptado: 23/09/2021

Introducción

Las enfermedades cerebrovasculares constituyen una de las primeras causas de muerte y la principal causa de discapacidad adquirida a nivel mundial. Las de tipo isquémico, debido a la oclusión de un vaso sanguíneo cerebral, resultan las más frecuentes con más de un 80 % de incidencia.⁽¹⁾ La disminución de sangre en el cerebro trae consigo la depleción de glucosa y oxígeno, y desencadena una serie de procesos celulares y moleculares, conocidos como cascada isquémica, que finalizan con la muerte celular. El activador plasminógeno tisular recombinante se ha aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos como único fármaco para el tratamiento de la isquemia cerebral; sin embargo, sus beneficios se asocian al riesgo de hemorragia y neurotoxicidad.⁽²⁾ Por consiguiente, la búsqueda de un tratamiento para la isquemia cerebral se ha convertido en una de las principales líneas de investigación con más de 30 mil publicaciones solo en la primera mitad del año 2020.

La introducción de una nueva estrategia terapéutica necesita primero comprobar su efecto neuroprotector o neuroreparador mediante ensayos preclínicos; para ello se usan modelos *in vivo* o *in vitro* que dilucidan los mecanismos celulares y moleculares del tratamiento estudiado, además de entender la fisiopatología de la enfermedad.

Existen diferentes tipos de modelos *in vitro* de isquemia cerebral. Las diferencias se encuentran en el proceso de la cascada isquémica, así como por el tipo celular utilizado. La presente revisión tuvo como objetivo describir la actualidad de los modelos *in vitro* de la isquemia cerebral.

Métodos

Se realizó una revisión sistemática de los modelos *in vitro* de isquemia cerebral utilizados en los últimos cinco años en la base de datos científicas PubMed y Web of Science con los términos de búsqueda *stroke in vitro experiments*, *brain ischemia in vitro experiments*. Se tuvieron en cuenta los procesos de la cascada isquémica simulada, el tipo celular y los indicadores isquémicos. Se priorizaron los artículos originales publicados entre 2015-2020.

Cascada isquémica

La isquemia desencadena cambios moleculares y celulares conocidos como cascada isquémica. A causa de la disminución del flujo sanguíneo en el cerebro, merma la entrada de oxígeno y glucosa, y con ello se produce la depleción del adenosín trifosfato. Esto produce en la neurona la despolarización de la membrana celular debido al fallo de la bomba Na^+/K^+ . Esta despolarización abre los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes y desbloquea los receptor-dependientes, por lo cual entran grandes cantidades de Ca^{2+} al espacio intracelular. Como resultado se mantiene la despolarización de la membrana neuronal y aumenta la liberación de diversos aminoácidos excitadores. Entre ellos, el glutamato que, al sobrepasar los límites tolerables, genera fenómenos de excitotoxicidad, así como una activación prolongada de sus receptores neuronales. Este ciclo se agrava por la despolarización de la membrana en el astrocito, que tiene como una de sus funciones fisiológicas la recaptación del glutamato.⁽³⁾ Instaurado el proceso isquémico, primero ocurre la necrosis neuronal y glial irreversible; luego, la entrada de iones de Na^+ y Cl^- causa edema citotóxico y la entrada de agua rompe la membrana celular en el núcleo isquémico.

La vía de muerte celular por apoptosis se activa en la zona de penumbra isquémica y puede evolucionar a infarto.⁽²⁾ El aumento de Ca^{2+} intracelular a niveles suprafisiológicos activa varias vías apoptóticas que culminan en la liberación de proteasas, lipasas, endonucleasas y óxido nítrico sintasas que degradan las proteínas del citoesqueleto, la matriz extracelular y los ácidos nucleicos. Se produce, además, una disfunción mitocondrial por cambios en la membrana, la apertura de canales iónicos y la consecuente liberación de moléculas proapoptóticas.

Los electrones libres acumulados en la mitocondria reaccionan con el oxígeno procedente de una reperfusión y producen aniones superóxidos (O^-). EL O^- constituye el radical libre que inicia la cascada de estrés oxidativo. Sin embargo, se forman otros como el radical hidroxilo (OH^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado por la superóxido dismutasa. La formación de radicales libres ocasiona alteraciones celulares por la oxidación de lípidos, ADN y proteínas.⁽²⁾

Los procesos de neurotoxicidad y estrés oxidativo activan las microglías y los astrocitos, que secretan citoquinas proinflamatorias como $\text{TNF}\alpha$, IL-6, and IL-1 β .⁽⁴⁾ Estas citoquinas empeoran el proceso inflamatorio mediante la infiltración y reclutamiento de monocitos, neutrófilos, células-T y células NK. El aumento de los radicales libres y la acción de metaloproteasas de la matriz comprometen la integridad de la barrera hematoencefálica. Esto conlleva a la infiltración de las

células del sistema inmune no residentes y toxinas que exacerbaban el daño celular.

Modelos *in vitro*

Basados en la cascada isquémica, los modelos de isquemia cerebral utilizados *in vitro* se dividen en generales y específicos. Los primeros permiten el estudio de los procesos derivados de la hipoxia inicial y los segundos, el estudio de mecanismos de acción asociados directamente a procesos específicos. En los modelos generales se incluyen los de privación de oxígeno y glucosa (OGD del inglés *Oxygen and Glucose deprivation*), con y sin reperfusión; y pueden acompañarse de una reoxigenación (OGD/R). En los específicos destacan los que simulan los procesos de excitotoxicidad, estrés oxidativo e inflamación. En este tipo de estudios se añaden al cultivo celular diversas sustancias como glutamato, H₂O₂, y lipopolisacáridos (LPS) o citoquinas (fig.).

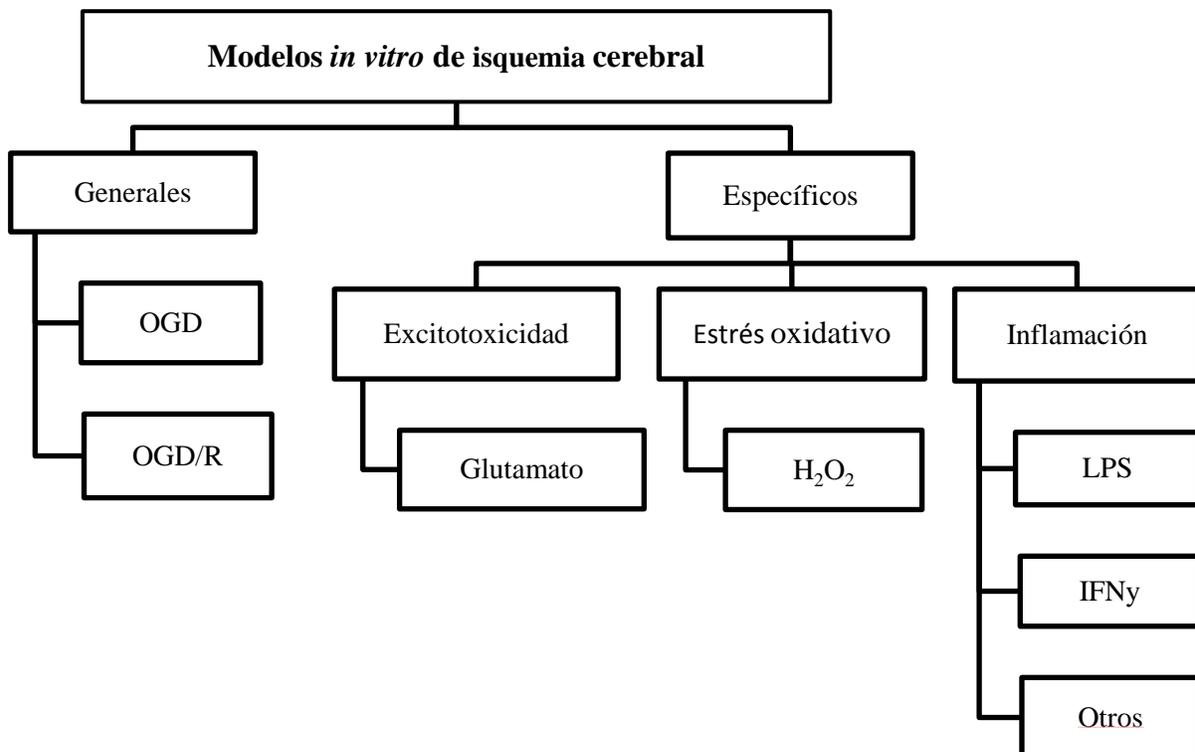


Fig. - Modelos *in vitro* utilizados en el estudio de la isquemia cerebral.

Los procesos bioquímicos de la cascada isquémica se diferencian entre las neuronas, la glía y el componente vascular; por ello en las investigaciones se utilizan células neuronales o similares, microglías, astrocitos y células endoteliales.

Modelos de privación de oxígeno y glucosa (OGD)

El daño celular isquémico resulta de la reducción del suministro de oxígeno y glucosa; por tanto, este modelo representa las condiciones patológicas iniciales de la isquemia. En esta técnica las células se colocan en un medio de cultivo que, entre otros componentes, contiene glucosa y se incuban a 37°C, atmósfera de 5 % CO₂ y 20 % O₂. Cuando se alcanza la fase de crecimiento exponencial, las células se ubican en un nuevo medio sin glucosa y con valores de O₂ que varían entre el 1 y 0 %. El proceso de reoxigenación se simula y se retornan las células a un cultivo con las condiciones iniciales. Estos modelos se diferencian por el tiempo de OGD, el de reoxigenación y el tipo celular empleado (tabla 1).

Tabla 1 - Modelos de OGD y OGD/R según tipo celular, tiempo de privación de oxígeno y glucosa/reoxigenación e indicadores de isquemia analizados

| Tipo celular | | Tiempo | Indicadores de isquemia |
|-------------------|---------------------------------------|---|---|
| OGD | | | |
| Neurona | Neuro-2a | 4h ⁽⁵⁾ 6h ⁽⁶⁾ | ↑muerte celular, ^(5,6) ↑Caspasa-3 ⁽⁵⁾ ↓p-Akt ⁽⁶⁾ |
| | PC-12 ⁽⁷⁾ | 6h | ↓viabilidad celular |
| Microglía | HMO6 ⁽⁸⁾ | 4h | ↓supervivencia celular, ↑Ca ²⁺ y ROS |
| | BV2 ⁽⁹⁾ | 0,6,12,24h | ↑proteína INF-γ, TNF-α, IL-1β, IL-6, e IL-8 |
| Célula endotelial | Microvascular primaria ⁽⁵⁾ | 16h | ↑muerte celular, ↑actividad Caspasa-3, ↑mRNA IL-6, MCP-1 y E-selectina |
| OGD/R | | | |
| Neurona | Corticales primarias | 70min/24h ⁽¹⁰⁾ 5min/24h ⁽¹¹⁾ | ↑muerte celular |
| | HT-22 ⁽¹²⁾ | 8h/12h | ↑proteína iNOS, Arg-1, IL-1β, NF-kBp65, p-NF-kBp65, NLRP3, TLR4 |
| | SY-SH5Y | 6h/24h ⁽¹³⁾ 24h/48h ⁽¹⁴⁾ | ↑muerte celular, ROS ⁽¹³⁾ ↓masa mitocondrial, tasa respiratoria máxima, COX ⁽¹⁴⁾ ↑Caspasa-3/9 ⁽¹⁴⁾ |

| | | | |
|-------------------|---|---|--|
| | | | ↓mRNA, CREB, Bcl-2 ⁽¹⁴⁾ |
| Microglía | Microglías primarias ⁽¹⁵⁾ | 4h/12h | ↑mRNA de TNF- α , IL-1 β , iNOS, e IL-10 ↑pNF- κ B |
| | BV2 | 3h/21h ⁽¹⁶⁾ 6h/12h ⁽¹²⁾ | ↑niveles y mRNA de TNF- α , IL-1 β , TGF- β e IL-10 ⁽¹⁶⁾ ↑mRNA CD16, CD32, y CD86 ⁽¹⁶⁾ ↓p/t-PKA y p/t-CREB ⁽¹⁶⁾ ↑IL-1 β , TLR4, NF- κ B, NLRP3 ⁽¹²⁾ |
| Astrocitos | Primarios | 6h/24h ⁽¹⁰⁾ 30min/24h ⁽¹¹⁾ | ↑muerte celular ⁽¹⁰⁾ ↑IL-1 α , IL-1 β , iNOS, MCP-1, TNF- α e IL-6 ⁽¹¹⁾ |
| Célula Endotelial | bEnd5 ⁽⁶⁾ | 6h/4h | ↑proteína de ICAM-1 y adhesión de monocitos ↓p-Akt |
| | Microvascular primaria ⁽¹⁷⁾ | 1h/24h | ↑apoptosis, permeabilidad, MMP-2/9 |
| | bEnd.3 ⁽¹⁶⁾ | 3h/21h | ↓viabilidad celular, ↑actividad Caspasa-3 ↓proteína ZO-1 y ocludinas |
| Cocultivos | Neuronas + microglía ⁽¹⁸⁾ | 3h/24h | ↓viabilidad neuronal ↑IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IL-33 |
| | Neuronas + astrocitos ⁽¹⁹⁾ | 45min/24h | ↓viabilidad celular ↑mRNA TNF- α , IL-6 ↓mRNA TGF- β , IL-10 |
| | Microglías + astrocitos ⁽¹¹⁾ | 30min/24h | ↑IL-1 α , IL-1 β , iNOS, MCP-1, TNF- α , IL-6 |
| | Endotelial + microvascular astrocitos | 1h/24h ⁽¹⁷⁾ | ↑apoptosis endotelial, permeabilidad, MMP-2/9 |
| | Cultivos organotípicos corticales | 20min/24h ⁽²⁰⁾ | ↑muerte celular ↑microglías activadas, fagocíticas |

Legenda: Neuro-2a: neuroblastoma de ratón; PC-12: feocromocitoma de rata; HMO6: microglía humana; BV2: microglía de ratón; HT-22 neurona hipocampal de ratón; SY-SH5Y: neuroblastoma humano; bEND5: endotelio de ratón; bEnd.3: célula endotelial derivada del cerebro de ratón.

Con el modelo de OGD se analizan indicadores de apoptosis, inflamación, daño mitocondrial y de la ruptura de la barrera hematoencefálica. La muerte o la viabilidad se observan en todos los tipos celulares. El desarrollo de las caspasas y la disminución de la proteína quinasa B y Bcl-2, ligadas a la supervivencia celular, se consideran otros indicadores apoptóticos.

El incremento de diversos marcadores proinflamatorios se estudia en todos los tipos celulares a niveles de expresión genética, proteica y concentraciones extracelulares. Se reporta el aumento de interleuquinas (IL) 1 α , 1 β , 6, 8 y 33, interferón gamma (INF- γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) con menos de una hora de OGD. Igualmente, se extiende el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), isoforma de la enzima NOS, en respuesta a estímulos de diversas citocinas que, al reaccionar con O $_2^-$, producen peroxinitrito en exceso y,

consecuentemente, toxicidad celular.⁽²¹⁾ El daño mitocondrial se evidencia con la disminución de la tasa respiratoria y el ascenso de la enzima citocromo-C oxidasa que favorece la sobreproducción de superóxidos.

El receptor tipo-Toll 4 (TLR4) constituye una proteína transmembrana, que se expresa en microglías, astrocitos y neuronas, e inicia cascadas proinflamatorias.⁽¹²⁾ Su activación desencadena la señalización mediante NF- κ B, que libera citocinas, quimioquinas y moléculas de adhesión. La ruta TLR4/NF- κ B resulta fundamental en la formación del inflamasoma de la proteína 3 del receptor nodular (NLRP3);⁽²²⁾ esta proteína estimula la caspasa-1 y la maduración de IL-1 β e IL-18. Los principales receptores y mediadores de esta ruta se manifiestan durante el proceso isquémico.

La ruta proteína quinasa A/ regula las citocinas antiinflamatorias y los factores relacionadas con la desactivación de la microglía; por tanto, sus valores durante los procesos de OGD se reducen. Marcadores del fenotipo antiinflamatorio de las microglías como IL10, factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), arginina-1 (Arg-1) se potencian luego del proceso isquémico; mas no a los niveles que los del fenotipo M1 (CD16, CD32 y CD86).⁽¹⁶⁾ Esto demuestra que ambos fenotipos se pueden inducir en los procesos isquémicos y analizarlos resulta indispensable para encontrar nuevas estrategias terapéuticas, teniendo en cuenta la neuroinflamación como factor principal.

Las células endoteliales, de manera individual o en cocultivos con astrocitos, permiten el estudio del efecto de la OGD en la barrera hematoencefálica. Se ha reportado un incremento de la MMP-2 y -9; la primera de tipo constitutiva y la segunda inducida por citoquinas. La MMP-2 comienza la degradación de proteínas de las células endoteliales y, eventualmente, de las proteínas de unión estrechas, como las ocludinas y la unión ocluyente-1, lo cual permeabiliza la membrana y rompe la barrera hematoencefálica.⁽²³⁾ En este tipo celular se han encontrado marcadores proinflamatorios relacionados con la adhesión leucocitaria como la proteína quimioatrayante de monocitos tipo-I (MCP-1), molécula de adhesión leucocito-endotelial 1 (E-selectina) y la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1).⁽⁶⁾

El modelo de OGD se ha utilizado en el estudio de cocultivos con medios condicionados sin contacto célula-célula. *Jin* y otros⁽¹¹⁾ estudiaron la supervivencia de neuronas sometidas a OGD y a medios de cultivo de microglías, astrocitos o cultivos mixtos. La exposición a los astrocitos provocó la muerte celular neuronal; sin embargo, se redujo con las microglías, luego de la OGD, y al cultivo mixto. Esto sugiere que las microglías limitan la respuesta inflamatoria de los astrocitos; por tanto, esta variante de cocultivo permite estudiar los efectos

de un tipo celular sobre otro. Además, en caso de reperfusión, el cambio hacia un medio no condicionado, podría estimular respuestas celulares que enmascaren otras rutas ya desencadenadas luego de la OGD.⁽²⁴⁾

Modelos específicos de excitotoxicidad, inflamación y estrés oxidativo

Entre los procesos más importantes vinculados a la cascada isquémica se encuentran la secreción de sustancias tóxicas, la inflamación y el estrés oxidativo. Aunque pueden estudiarse con el modelo OGD/R, no necesitan de incubadoras con condiciones de hipoxia porque solo requieren de sustancias que induzcan al proceso de interés.

El glutamato, principal responsable de los procesos citotóxicos luego de la isquemia, es la sustancia de elección para el modelo de excitotoxicidad. En el caso de la inflamación se utiliza LPS, componente de la membrana externa de las bacterias gramnegativas y endotoxina reconocida en la inducción exógena de la neuroinflamación mediada por las microglías. Otros inductores de la inflamación resultan las propias citoquinas y las proteínas que estimulan la respuesta inmune. El estrés oxidativo se provoca directamente con el H₂O₂, que se forma de manera natural durante la isquemia. En la tabla 2 se ejemplifican estos tres modelos.

Tabla 2 - Modelos de excitotoxicidad, estrés oxidativo e inflamación

| Tipo celular | | Concentración-Tiempo | Indicadores de isquemia |
|------------------------------------|---------------------------------------|---|---|
| Excitotoxicidad (Glutamato) | | | |
| Neuronas | PC-12 ⁽⁷⁾ | 15 mM-24h | ↓viabilidad celular |
| | SY-SH5Y ⁽²⁵⁾ | 1μM-24h | ↑muerte celular, ROS, mMP ↑proteína PARP, Caspasa-3, p-Ak |
| | Primarias | 100μM-4h ⁽²⁶⁾ 100μM-5min ⁽²⁷⁾ 5μM-10min ⁽²⁸⁾ | ↑apoptosis ^(26,27,28) ↑mRNA p53, Bax, Caspasa-3 ⁽²⁶⁾ ↓mRNA, ⁽²⁶⁾ proteína ⁽²⁷⁾ Bcl-2 ↑proteína Bax, citocromo-C, Caspasa-3 ⁽²⁷⁾ |
| Glía | Microglía/ Astrocitos ⁽²⁹⁾ | 125μM-20min | ↑NF-κB, IL-1β, COX-2 |
| Célula endotelial | TR-BBB ⁽³⁰⁾ | 1mM-24h | ↓viabilidad celular ↓mRNA eNOS ↑NO, mRNA iNOS |
| cocultivos | Neuronas corticales + | 10/100μM-20min | ↓supervivencia neuronal ↓número y |

| | | | |
|---|--|--|--|
| | Glía ⁽³¹⁾ | 100µM-24h | largo dendritas-24h |
| | Neurona + glía ⁽³²⁾ | 1mM-4h | ↑muerte celular, Caspasa-3 ↑mRNA IL-1β, IL-6, TNF-α ↓BDNF, GS, EEAT |
| Estrés Oxidativo(H₂O₂) | | | |
| Neuronas | SY-SH5Y | 100 µM-12 h ⁽¹³⁾ 200µM-12h ⁽²⁵⁾ | ↑muerte celular ^(13,25) |
| | PC-12 | 0,3 mM-4h ⁽⁷⁾ 70µM-2h ⁽³³⁾ | ↓viabilidad celular ^(7,33) |
| | Neuron-2a ⁽³⁴⁾ | 100µM-24h | ↓viabilidad celular, mMP, BDNF, mRNA Bcl-2 ↑apoptosis, NO, Ca ²⁺ , ROS ↑mRNA IL-1β, IL-6, TNF-α, Bax, iNOS ↑JAK-STAT |
| Célula endotelial | HBMECs ⁽³⁵⁾ | 300µM-24h | ↓viabilidad celular ↑MDA, ROS, 8 OhdG ↑mRNA/proteína IL-1β, IL-6, TNF-α, ↓SOD, GSH |
| Glía | Glía primaria ⁽³¹⁾ | 100/500µM-20min | ↑muerte celular |
| Cocultivo | Neuronas corticales + Glía ⁽³¹⁾ | 10/100µM-20min | ↑muerte neuronal |
| Inflamación | | | |
| Neurona | SHSY5Y ⁽²⁵⁾ | LPS(1µM/ml)-24h | ↑muerte celular |
| Glía | BV2 | LPS(500ng/ml)-24h ⁽³⁶⁾ | ↑mRNA iNOS, ⁽³⁷⁾ TNF-α, ^(36,37) IL-6, IL-1β, TLR4, NF-kB, ⁽³⁶⁾ IL-12, CD16, CD32 ⁽³⁷⁾ ↑proteína IL-1β, IL-6, TNF-α, TLR4, NF-kB, ⁽³⁶⁾ iNOS, ⁽³⁸⁾ NLRP3 ⁽³⁸⁾ ↑IL-6, ^(37,38) IL-12, IL-2, IL-1β, ⁽³⁷⁾ TNF ⁽³⁸⁾ ↓mRNA CD206, Arg-1 ⁽³⁷⁾ |
| | | LPS(100ng/ml) + IFN-γ (20ng/ml)-48h ⁽³⁷⁾ | |
| | | LPS (1µg/ml)-12h ⁽³⁸⁾ | |
| | N9 ⁽⁴⁾ | LPS(1µg/ml) | ↑TNF-α, IL-1β, IL-6 ↑ROS, JNK, invasión y fagocitosis celular |
| Microglía Primaria | LPS(10ng/ml)-24h ⁽³⁹⁾ | IFNγ(20ng/ml) + TNFα (50ng/ml-2)-24h ⁽³⁹⁾ | ↑mRNA NOS2, Arg1, ⁽³⁹⁾ TNF-α, IL-1β, IL-6, MCP1 ⁽²⁰⁾ ↑NO, ^(20,39) TNF-α, ROS ⁽²⁰⁾ ↑proteína iNOS, Arg1, COX-2 ⁽³⁹⁾ |
| | | Microglía + astrocito | LPS(1µg/ml)-24h ⁽²⁰⁾ |
| Célula endotelial | bEND5 ⁽⁶⁾ | TNF-α (50µg/ml)-4h | ↑proteína ICAM-1 |

Legenda: Neuro-2a: neuroblastoma de ratón; PC-12: feocromocitoma de rata; HMO6: microglía humana; BV2: microglía de ratón; N9: microglía de ratón; HT-22: neurona hipocampal de ratón; SY-SH5Y: neuroblastoma humano; bEND5: endotelioma de ratón; TR-BBB: célula endotelial capilar de cerebro de ratón.

Estos modelos contribuyen al estudio de los mecanismos de apoptosis, inflamación, citotoxicidad y daño mitocondrial. Las concentraciones de glutamato, LPS, citocina o H_2O_2 provocan la respuesta isquémica esperada, la cual varía en dependencia del tipo celular y las condiciones de cultivo; también se observan estudios en fase aguda (< 24h) y crónicos (> 24h).

El glutamato, aminoácido neurotransmisor, predomina en las células del sistema nervioso central; pero si sobrepasa los niveles fisiológicos resulta citotóxico. Las exposiciones prolongas en los modelos de excitotoxicidad por glutamato afecta a todos los tipos celulares: aumentan las proteínas proapoptóticas, como la polimerasa poly-ADP-ribosa, las caspasas, el factor de transcripción p53 y las quinasas, que unen y fosforilan a la proteína c-Jun. En las neuronas se incrementan los radicales libres, se pierde la membrana mitocondrial y disminuye el factor neurotrófico, derivado del cerebro y asociado a la supervivencia neuronal. En el caso de las células endoteliales, la exposición a altas dosis de glutamato reduce la isoforma endotelial de la eNOS, vital en los procesos de vasodilatación y angiogénesis, en contraste con el aumento de iNOS que se asemeja a lo obtenido en el modelo OGD. Igualmente, estudios en cocultivos arrojan que el glutamato restringe la glutamina-sintetasa y el transportador aminoácido excitador en los astrocitos.⁽³²⁾

El H_2O_2 se emplea en el modelo de lesión oxidativa celular. Este compuesto químico estimula a las especies reactivas del oxígeno que desencadenan la ruta mediada por NF- κ B e inducen el iNOS y la ciclooxigenasa-2. Se considera un oxidativo potente que promueve las citoquinas proinflamatorias, los factores apoptóticos, las Janus quinasas (JAK), que junto a las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT) forman la ruta JAK-STATs, importante vía de respuesta inflamatoria que media la respuesta inmune y la apoptosis celular; igualmente, reduce los niveles de factor neurotrófico derivado del cerebro.⁽³⁴⁾

Destaca el estudio de marcadores del estrés oxidativo con el malondialdehído, generado luego de la peroxidación lipídica, mediada por las especies reactivas del oxígeno.⁽³⁵⁾ Este modelo reporta valores elevados de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosina, un biomarcador de daño oxidativo en el ARN y ADN celular, y de marcadores de respuesta antioxidante como la superoxidismutasa y el glutatión, los cuales disminuyen luego de la incubación con H_2O_2 .

En el caso de los cocultivos, los efectos del H_2O_2 y el glutamato se diferencian por las células gliales. Por ejemplo, *Falucci* y otros⁽³¹⁾ necesitaron concentraciones de glutamato 10 veces mayores en cultivos con glía para que la muerte celular se asemejara a la obtenida en cultivos neuronales sin la capa

glial. Esto demuestra que las células gliales mantienen las concentraciones fisiológicas de glutamato. En el caso del H₂O₂ se observa un patrón similar.

En el modelo de inflamación se utilizan básicamente LPS o citocinas. Este tipo de prueba se aplica sobre todo a células gliales, pero se observan indicadores isquémicos en células endoteliales y neuronales. En las microglías se estudian indicadores proinflamatorios como citocinas e iNOS, la producción de óxido nítrico, las especies reactivas del oxígeno y el aumento de la actividad de las caspasas. Otros marcadores proinflamatorios resultan CD16, CD32, CD197.^(20,37,40)

El LPS se emplea para obtener microglías de fenotipo M1 y provoca mejores resultados que las citocinas en el proceso inflamatorio;^(12,16,18) aunque estas últimas acercan el modelo a lo que fisiológicamente sucede luego del proceso isquémico. Además, citocinas proinflamatorias como el IFN γ o el TNF- α ^(4,6,37) se hallan en enfermedades del sistema nervioso central, no así el LPS.

Similar a los estudios con OGD, los marcadores antiinflamatorios se pueden potenciar o reducir luego del estímulo inflamatorio, lo que estimula los dos fenotipos de microglías, aunque siempre el fenotipo M1 alcanza niveles superiores. El fenotipo M2 se desarrolla a partir de citocinas como el Il-4.⁽³⁹⁾

En los modelos híbridos los cultivos se someten a más de un estímulo isquémico y se obtienen indicadores mayores que en las formas individuales. Ye y otros⁽¹²⁾ recurrieron a OGD/R (8h/12h) con LPS (1 μ g/ml) en líneas neuronales y gliales. Este tipo de cultivo tridimensional preserva la arquitectura del órgano estudiado y la mayoría de sus interacciones. Por su parte, Liao y otros⁽⁴¹⁾ emplearon un cultivo organotípico de hemisferio cerebral completo y determinaron un aumento de citocinas proinflamatorias ante la estimulación con LPS.

Elegir el cultivo apropiado constituye un aspecto importante en cualquiera de los modelos utilizados. En todos los tipos celulares se observan los marcadores isquémicos básicos: muerte celular, estrés oxidativo, liberación de citocinas y marcadores proinflamatorios. La selección de una línea celular resulta conveniente debido a su fácil manejo, la reducción del número de animales y la variedad de publicaciones que la mencionan; sin embargo, las células primarias se asemejan mucho más a un modelo *in vivo* y se manejan en prototipos más avanzados, como los cocultivos.

Los modelos *in vitro* permiten el análisis específico de rutas moleculares y mecanismos de acción, pero no manifiestan las interacciones de los diferentes tipos celulares del organismo. Los cocultivos y cultivos organotípicos aminoran esta desventaja, aunque el análisis de los resultados *in vitro* debe extrapolarse con cuidado. Esto se hace aún más crítico en el estudio de la isquemia cerebral

porque la integración del componente vascular con las células nerviosas y gliales desempeña un papel importante en la evolución de la lesión isquémica.

Conclusiones

Los modelos *in vitro* de isquemia cerebral se clasifican, según el proceso que modelan, en generales o específicos. Los primeros permiten el estudio desde la hipoxia inicial, mientras que los segundos se enfocan en procesos específicos mediante el uso de inductores de excitotoxicidad, estrés oxidativo o inflamación. De forma general, estos contribuyen a la investigación de mecanismos de apoptosis, inflamación, citotoxicidad y daño mitocondrial.

Todos los tipos celulares de la unidad neurovascular pueden usarse en estos modelos; sin embargo, para los inflamatorios se prefieren las células gliales, y los de excitotoxicidad se analizan en neuronas o células endoteliales.

Los modelos *in vitro* se limitan por la representación parcial de las interacciones de los fenómenos *in vivo*, situación que se soluciona con el uso de células primarias o cocultivos. La selección de un modelo en específico dependerá de los mecanismos de acción de interés y posibilidades de experimentación, pero se considera indispensable optimizar los protocolos y analizarlos adecuadamente para su extrapolación.

Referencias bibliográficas

1. Sommer CJ. Ischemic stroke: experimental models and reality. Acta Neuropathol. 2017;133(2):245-61. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1667-0>
2. Patnaik R, Kumar A, Ashish T. Advancement in the Pathophysiology of cerebral stroke. Singapore: Springer Singapore; 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1453-7>
3. Sontheimer H. Cerebrovascular infarct: Stroke. Diseases of the nervous system. 2015;3-28. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800244-5.00001-X>
4. Merighi S, Gessi S, Bencivenni S, Battistello E, Vincenzi F, Setti S, *et al.* Signaling pathways involved in anti-inflammatory effects of Pulsed

Electromagnetic Field in microglial cells. *Cytok.* 2020;125:154777. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154777>

5. Zhang X, Tang X, Liu K, Hamblin MH, Yin K-J. Long noncoding RNA Malat1 regulates cerebrovascular pathologies in ischemic stroke. *J Neurosci.* 2017;37(7):1797-806. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3389-16.2017>

6. Martins AH, Hu J, Xu Z, Mu C, Alvarez P, Ford B, *et al.* Neuroprotective activity of (1S,2E,4R,6R,-7E,11E)-2,7,11-cembratriene-4,6- diol (4R) in vitro and in vivo in rodent models of brain ischemia. *Neurosci.* 2015;291:250-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.001>

7. Rajput SK, Sharma AK, Meena CL, Pant AB, Jain R, Sharma SS. Effect of L-pGlu-(1-benzyl)-l-His-l-Pro-NH₂ against in-vitro and in-vivo models of cerebral ischemia and associated neurological disorders. *Biomed Pharmacother.* 2016;84:1256-65. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.059>

8. Duong CN, Kim JY. Exposure to electromagnetic field attenuates oxygen-glucose deprivation-induced microglial cell death by reducing intracellular Ca²⁺ and ROS. *Int J Radiat Biol.* 2016;92(4):195-201. DOI: <https://doi.org/10.3109/09553002.2016.1136851>

9. Xiang J, Zhang X, Fu J, Wang H, Zhao Y. USP18 overexpression protects against focal cerebral ischemia injury in mice by suppressing microglial activation. *Neurosci.* 2019;149:121-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.09.001>

10. Sun X, Jung J-H, Arvola O, Santoso MR, Giffard RG, Yang PC, *et al.* Stem cell-derived exosomes protect astrocyte cultures from in vitro ischemia and decrease injury as post-stroke intravenous therapy. *Cell Neurosci.* 2019;13:1-9. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00394>

11. Jin W, Shi SX, Li Z, Li M, Wood K, Gonzales RJ, *et al.* Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(6):2224-36. DOI: <https://doi.org/10.1177/0271678X17694185>

12. Ye Y, Jin T, Zhang X, Zeng Z, Ye B, Wang J, *et al.* Meisoindigo protects against focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and regulating microglia/macrophage polarization via TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Cell Neurosci.* 2019;13:1-18. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00553>

13. Imai T, Matsubara H, Nakamura S, Hara H, Shimazawa M. The mitochondria-targeted peptide, bendavia, attenuated ischemia/reperfusion-induced stroke

damage. Neurosci. 2020;443:110-9. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.07.044>

14. Lin C, Nicol CJB, Cheng Y, Yen C, Wang Y. Neuroprotective effects of resveratrol against oxygen glucose deprivation induced mitochondrial dysfunction by activation of AMPK in SH-SY5Y cells with 3D gelatin scaffold. Brain Res. 2020;1726:146492. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146492>

15. Wu R, Li X, Xu P, Huang L, Cheng J, Huang X, *et al.* TREM2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury. Molec Brain. 2017;10(1):20. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0296-9>

16. Li C, Bian Y, Feng Y, Tang F, Wang L, Hoi MPM, *et al.* Neuroprotective effects of BHDPc, a novel neuroprotectant, on experimental stroke by modulating microglia polarization. Neurosci. 2019;10(5):2434-49. DOI: <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00713>

17. Li C, Wang X, Cheng F, Du X, Yan J, Zhai C, *et al.* Geniposide protects against hypoxia/reperfusion-induced blood-brain barrier impairment by increasing tight junction protein expression and decreasing inflammation, oxidative stress, and apoptosis in an in vitro system. Eur J Pharmacol. 2019;854:224-31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.04.021>

18. Jiang M, Liu X, Zhang D, Wang Y, Hu X, Xu F, *et al.* Celastrol treatment protects against acute ischemic stroke-induced brain injury by promoting an IL-33/ST2 axis-mediated microglia/macrophage M2 polarization. J Neuroinflammat. 2018;15(1):78. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1124-6>

19. Kadri S, El Ayed M, Limam F, Aouani E, Mokni M. Preventive and curative effects of grape seed powder on stroke using in vitro and in vivo models of cerebral ischemia/reperfusion. Biomed Pharmacother. 2020;125:109990. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109990>

20. Parada E, Casas AI, Palomino A, Gómez V, Rubio A, Farré V, *et al.* Early toll-like receptor 4 blockade reduces ROS and inflammation triggered by microglial pro-inflammatory phenotype in rodent and human brain ischaemia models. Br J Pharmacol. 2019;176(15):2764-79. DOI: <https://doi.org/10.1111/bph.14703>

21. Salehpour F, Farajdokht F, Mahmoudi J, Erfani M, Farhoudi M, Karimi P, *et al.* Photobiomodulation and coenzyme Q10 treatments attenuate cognitive impairment associated with model of transient global brain ischemia in artificially aged mice. Neurosci. 2019;13:1-17. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00074>

22. Zhong X, Liu M, Yao W, Du K, He M, Jin X, *et al.* Epigallocatechin-3-gallate attenuates microglial inflammation and neurotoxicity by suppressing the activation of canonical and noncanonical inflammasome via TLR4/NF- κ B pathway. *Mol Nutr Food Res.* 2019;63(21):1801230. DOI: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201801230>
23. Yang Y, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke. *Brain Res.* 2015;1623:30-8. DOI: <https://doi.org/10.1016%2Fj.brainres.2015.04.024>
24. Lun H, Wen C, Jia J, Li HE, Han H, Li F, *et al.* Scutellarin exerts anti-inflammatory effects in activated microglia/brain macrophage in cerebral ischemia and in activated BV 2 microglia through regulation of MAPKs signaling pathway. *NeuroMol Med.* 2020;22:264-77. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12017-019-08582-2>
25. Imai T, Iwata S, Miyo D, Nakamura S, Shimazawa M, Hara H. A novel free radical scavenger , NSP-116 , ameliorated the brain injury in both ischemic and hemorrhagic stroke models. *J Pharmacol Sci.* 2019;141(3):119-26. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2019.09.012>
26. Yu H, Wang X, Kang F, Chen Z, Meng Y, Dai M. Neuroprotective effects of midazolam on focal cerebral ischemia in rats through antiapoptotic mechanisms. *Int J Mol Med.* 2019;43(1):443-51. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3973>
27. Garzón F, Coimbra D, Parcerisas A, Rodriguez Y, García JC, Soriano E, *et al.* NeuroEPO preserves neurons from glutamate-induced excitotoxicity. *J Alzh Dis.* 2018;65(4):1469-83. DOI: <https://doi.org/10.3233/JAD-180668>
28. Khansari PS, Halliwell RF. Mechanisms underlying neuroprotection by the NSAID mefenamic acid in an experimental model of stroke. *Neurosci.* 2019;13(64):1-10. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00064>
29. Barrera AM, Osorio E, Cardona GP. Microglial-targeting induced by intranasal linalool during neurological protection postischemia. *Eur J Pharmacol.* 2019;857:172420. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172420>
30. Lee K, Kang Y. L -Citrulline restores nitric oxide level and cellular uptake at the brain capillary endothelial cell line (TR-BBB cells) with glutamate cytotoxicity. *Microvasc Res.* 2018;120:29-35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2018.05.010>
31. Falcucci RM, Wertz R, Green JL, Meucci O, Salvino J, Fontana ACK. Novel positive allosteric modulators of glutamate transport have neuroprotective

properties in an in vitro excitotoxic model. *Neurosci.* 2019;10(8):3437-53. DOI: <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.9b00061>

32. dos Santos C, Socorro M, Lima EP, dos Santos CC, Bispo A, Pedral G, *et al.* Agathisflavone, a flavonoid derived from *Poincianella pyramidalis* (Tul.), enhances neuronal population and protects against glutamate excitotoxicity. *Neurotoxicol.* 2018;65:85-97. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.02.001>

33. Duan LH, Li M, Wang CB, Wang QM, Liu QQ, Shang WF, *et al.* Protective effects of organic extracts of *Alpinia oxyphylla* against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Neural Regen Res.* 2020;15(4):682-9. DOI: <https://doi.org/10.4103%2F1673-5374.266918>

34. Liu J, Zhu T, Niu Q, Yang X, Suo H, Zhang H. *Dendrobium nobile* alkaloids protects against H₂O₂-induced neuronal injury by suppressing JAK-STATs pathway activation in N2A cells. *Biol Pharm Bull.* 2020;43(4):716-24. DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-01083>

35. Jiang Z, Wang W, Guo C. Tetrahydroxy stilbene glucoside ameliorates H₂O₂-induced human brain microvascular endothelial cell dysfunction in vitro by inhibiting oxidative stress and inflammatory responses. *Mol Med Rep.* 2017;16(4):5219-24. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7225>

36. Luo Y, Wang C, Li W, Liu J, He HH, Long JH, *et al.* Madecassoside protects BV2 microglial cells from oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced injury via inhibition of the toll-like receptor 4 signaling pathway. *Brain Res.* 2018;1679:144-54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.11.030>

37. Liu Z, Ran Y, Huang S, Wen S, Zhang W, Liu X, *et al.* Curcumin protects against ischemic stroke by titrating microglia/macrophage polarization. *Aging Neurosci.* 2017;9:233. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00233>

38. Yang Y, Boza A, Dunning CJR, Clausen BH, Lambertsen KL, Deierborg T. Inflammation leads to distinct populations of extracellular vesicles from microglia. *J Neuroinflammat.* 2018;15(1):168. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1204-7>

39. Lively S, Schlichter LC. Microglia responses to pro-inflammatory stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and reprogramming by resolving cytokines (IL-4, IL-10). *Cell Neurosci.* 2018;12:215. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00215>

40. Prasad A, Teh DBL, Blasiak A, Chai C, Wu Y, Gharibani PM, *et al.* Static magnetic field stimulation enhances oligodendrocyte differentiation and secretion of neurotrophic factors. *Sci Rep.* 2017;7(1):6743. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06331-8>

41. Liao R, Wood TR, Nance E. Superoxide dismutase reduces monosodium glutamate-induced injury in an organotypic whole hemisphere brain slice model of excitotoxicity. J Biol Eng. 2020;14:3. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13036-020-0226-8>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.