



## EDITORIAL

# ¿Cómo reparar el daño cerebral isquémico? Utilidad de los modelos experimentales en la búsqueda de respuestas

R. Prieto-Arribas<sup>a,\*</sup>, J.M. Pascual-Garvi<sup>b</sup>, F. González-Llanos<sup>c</sup> y J.M. Roda<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Neurocirugía, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España

<sup>b</sup> Servicio de Neurocirugía, Hospital de La Princesa, Madrid, España

<sup>c</sup> Servicio de Neurocirugía, Hospital Virgen de La Salud, Toledo, España

<sup>d</sup> Servicio de Neurocirugía, Hospital La Paz, Madrid, España

Recibido el 17 de mayo de 2010; aceptado el 21 de mayo de 2010

### PALABRAS CLAVE

Infarto cerebral;  
Isquemia cerebral;  
Modelos  
experimentales

**Resumen** El objetivo principal de los modelos experimentales de isquemia cerebral es el estudio del daño isquémico cerebral en condiciones fisiológicamente controladas y reproducibles. Los estudios realizados han sido esenciales para establecer nuevos conceptos sobre los mecanismos subyacentes al daño cerebral isquémico tales como la penumbra isquémica, el daño por reperfusión, los mecanismos de muerte celular o la importancia del daño sufrido por las mitocondrias, las células gliales y la sustancia blanca. Sin embargo, debido a la discrepancia entre los estudios experimentales y clínicos respecto a la eficacia de las terapias que tratan de aminorar o revertir el daño isquémico cerebral, existe una polémica creciente en torno a la utilidad clínica de los modelos experimentales de isquemia cerebral. Uno de los principales motivos del fracaso de las diversas estrategias terapéuticas ensayadas en el ámbito clínico es el enfoque teórico reduccionista de la mayoría de los ensayos farmacológicos, que analizan el efecto de una molécula con un mecanismo de acción conocido dentro de una ruta concreta de progresión del daño isquémico. Este abordaje contrasta con la complejidad estructural y funcional del tejido cerebral y la intrincada fisiopatología de las alteraciones celulares y moleculares inducidas por la isquemia. Creemos que el objetivo fundamental de los estudios realizados en modelos experimentales de isquemia cerebral debe ser la obtención de conocimientos básicos acerca de los procesos patobiológicos subyacentes al daño isquémico y que los ensayos clínicos no deberían iniciarse con agentes terapéuticos cuyos beneficios hayan sido escasos o inconsistentes en los estudios experimentales.

© 2010 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Véase contenido relacionado en DOI: [10.1016/j.nrl.2010.09.001](https://doi.org/10.1016/j.nrl.2010.09.001).

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [rprieto29@hotmail.com](mailto:rprieto29@hotmail.com) (R. Prieto-Arribas).

**KEYWORDS**

Cerebral stroke;  
Ischemic brain injury;  
Experimental models

**How to repair an ischemic brain injury? Value of experimental models in search of answers**

**Abstract** The major aim of experimental models of cerebral ischemia is to study the cerebral ischemic damage under controlled and reproducible conditions. Experimental studies have been fundamental in the establishment of new concepts regarding the mechanisms underlying the ischemic brain injury, such as the ischemic penumbra, the reperfusion injury, the cell death or the importance of the damage induced on mitochondria, glial cells and white matter. Disagreement between experimental and clinical studies regarding the benefit of drugs to reduce or restore the cerebral ischemic damage has created a growing controversy about the clinical value of the experimental models of cerebral ischemia. One of the major explanations for the failure of the clinical trials is the reductionist approach of most therapies, which are focused on the known effect of a single molecule within a specific pathway of ischemic damage. This philosophy contrasts to the complex morphological design of the cerebral tissue and the complex cellular and molecular physiopathology underlying the ischemic brain injury. We believe that the main objective of studies carried out in experimental models of cerebral ischemic injury must be a better understanding of the fundamental mechanisms underlying progression of the ischemic injury. Clinical trials should not be considered if the benefit obtained in experimental studies is limited or weak.

© 2010 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

*[Las neuronas son] las misteriosas mariposas del alma, cuyo batir de las alas quién sabe si esclarecerán algún día el secreto de la vida mental.*

*Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)*

Existe una polémica creciente en torno a la utilidad clínica de los modelos experimentales de isquemia cerebral, alimentada por la discrepancia observada entre los estudios experimentales y los ensayos clínicos respecto a la eficacia de las terapias que tratan de aminorar o revertir el daño isquémico cerebral<sup>1</sup>. Más de dos décadas de intenso trabajo que abarcan miles de estudios experimentales y cientos de estudios clínicos con un coste global de billones de dólares parecen baldíos, al no haberse hallado ninguna terapia efectiva capaz de aminorar el daño isquémico cerebral, a excepción de la terapia trombolítica con factor activador del plasminógeno, que se estima aplicable a tan sólo un 5% de los pacientes admitidos y diagnosticados de un ictus en la urgencia hospitalaria<sup>2,3</sup>. ¿Debemos por ello concluir que los modelos experimentales de isquemia cerebral son irrelevantes para el diseño y ensayo de terapias farmacológicas que puedan aplicarse con éxito a los pacientes con daño cerebral isquémico? Aunque por el momento no podemos emitir una respuesta definitiva, no parece lógico que el mero fracaso de la aplicación de terapias farmacológicas en el ámbito clínico sea el argumento que conduzca al rechazo de unos modelos que nos han proporcionado un ingente volumen de información acerca de los mecanismos de progresión del daño cerebral isquémico.

Los modelos animales de isquemia cerebral comenzaron a desarrollarse en la década de los años 70 del pasado siglo con el objetivo de poder estudiar el daño isquémico cerebral en condiciones fisiológicamente controladas y reproducibles. Gracias al trabajo realizado con estos modelos hemos atisbado la complejidad de la respuesta cerebral ante un daño isquémico. El término "isquemia cerebral" suele evocar en nuestras mentes la imagen de un enmarañado algoritmo en

el que múltiples cascadas de eventos celulares se activan secuencialmente en el parénquima cerebral expuesto a un flujo sanguíneo reducido. Todos los procesos de daño celular iniciados por el déficit en el aporte de oxígeno y glucosa al tejido nervioso confluyen en la despolarización masiva de las neuronas, la liberación incontrolada o "excitotóxica" de neurotransmisores excitatorios y la consiguiente activación incontrolada de enzimas calcio-dependiente como fosfolipasas y proteasas que degradan irreversiblemente las proteínas y fosfolípidos de las membranas celulares determinando finalmente la muerte celular<sup>4,5</sup>. Estos son los conceptos clásicos acerca de la fisiopatología de la muerte celular isquémica que hemos aprendido a lo largo de las últimas tres décadas. Sin embargo, se ha ido acumulando un enorme volumen de información sobre las alteraciones neurofisiológicas, bioquímicas y genéticas causadas por la isquemia cerebral. Sólo en los últimos 5 años el portal de información biomédica PUBMED ha incluido más de 20.000 artículos bajo la palabra clave "cerebral ischemia". Este enorme aporte de datos parece entrar en contradicción con la aceptación de esquemas fisiopatológicos simplistas, como los empleados en la mayoría de los ensayos clínicos, y puede ser uno de los principales motivos del fracaso de las diversas estrategias terapéuticas ensayadas en el ámbito clínico. Frente al enfoque teórico reduccionista de la mayoría de los ensayos farmacológicos, que tratan de analizar el efecto de una molécula con un mecanismo de acción conocido dentro de una ruta concreta de progresión del daño isquémico, la complejidad estructural y funcional del tejido cerebral y la intrincada fisiopatología de las alteraciones celulares y moleculares inducidas por la isquemia suponen un enorme desafío para la obtención de efectos terapéuticos reproducibles. En principio, la ausencia de beneficio clínico en un paciente que ha sufrido un ictus y ha recibido un tratamiento dirigido a una única diana terapéutica no debería atribuirse exclusivamente a las diferencias aparentes entre los cerebros de dos especies tan alejadas como un roedor y un ser humano. Es

evidente que las condiciones experimentales no pueden considerarse más que una aproximación a la situación humana, pero además no hay que olvidar que la mayoría de los estudios experimentales farmacológicos tratan de demostrar una reducción cuantitativa del volumen del infarto isquémico, asumiendo una homogeneidad estructural y funcional del tejido cerebral que ineludiblemente va a limitar la reproducibilidad de los resultados terapéuticos en el ámbito clínico. No deberíamos restringirnos a culpar al modelo experimental cuando éste no permite extrapolar resultados en la forma "prevista" a nuestra hipótesis, sino que deberíamos asumir inicialmente las limitaciones de cualquier abordaje terapéutico frente a la complejidad de las variables implicadas en la progresión del daño isquémico cerebral. Precisamente, los modelos experimentales han sido esenciales para establecer nuevos conceptos sobre los mecanismos subyacentes al daño cerebral isquémico y dentro de ellos nos gustaría exponer someramente los más relevantes:

### El concepto de umbrales de flujo y de penumbra isquémica

El desarrollo de terapias frente a la isquemia cerebral se basa en el concepto teórico de la posibilidad de actuación precoz sobre un volumen de tejido cerebral sometido a una reducción de flujo sanguíneo en el que no se ha producido un daño irreversible de sus células, y en el que se puede potencialmente restablecer su homeostasis bioquímica y neurofisiológica<sup>6</sup>. El problema es cómo identificar espacial y temporalmente ese volumen de tejido sometido a condiciones de penumbra isquémica, cuya definición precisa sigue debatiéndose en la actualidad. La medición del flujo sanguíneo cerebral (FSC) en el tejido nervioso no es suficiente por sí misma para identificar la zona de tejido en condiciones de penumbra. Estudios realizados en primates demostraron que el valor umbral de flujo sanguíneo capaz de causar una alteración metabólica y funcional crítica de las neuronas se sitúa en un rango entre 10 y 15 ml/100 g/min, y que el daño del tejido depende no sólo de la intensidad de la disminución del FSC sino también de su duración y de otras variables tanto anatómicas (patrón de circulación colateral) como fisiológicas (temperatura tisular, el nivel de glucosa)<sup>7,8</sup>. Los estudios metabólicos realizados en modelos experimentales de isquemia cerebral han establecido una definición dinámica de la penumbra isquémica, que sería aquella zona de tejido con un FSC reducido y un consumo aumentado de glucosa que se metaboliza anaeróticamente<sup>9</sup>. Los estudios histológicos siempre muestran un límite preciso entre la zona de tejido con un daño estructural irreversible - zona infartada o core- y el tejido cerebral sin alteraciones estructurales, no identificando ninguna franja intermedia correspondiente a la zona de penumbra<sup>10</sup>. Sin embargo, la identificación del volumen de tejido potencialmente salvable en pacientes que han sufrido un daño isquémico es muy difícil de realizar con precisión. Se ha recurrido a diferencias específicas de resonancia magnética (RM) para diferenciar la zona de penumbra de la zona infartada<sup>11,12</sup>. Considerando que el fallo de los gradientes iónicos transmembrana conducen a un *swelling* o hinchazón celular rápido y a la consiguiente reducción del espacio extracelular y de

la movilidad de las moléculas de agua que lo ocupan, se ha definido la zona infartada como aquella que muestra una perfusión reducida y una alteración de la señal en las secuencias potenciadas en difusión<sup>13</sup>. La zona de penumbra se ha diferenciado del tejido infartado por presentar un *mismatch* o "desajuste" entre ambas secuencias de RM, es decir por mostrar una perfusión reducida pero sin asociar alteraciones de señal en las imágenes potenciadas en difusión<sup>14</sup>. Este concepto "neurorradiológico" de la penumbra no puede equipararse de forma directa con el concepto metabólico definido mediante técnicas de autorradiografía de glucosa marcada en modelos experimentales, y por otro lado, el correlato fisiopatológico celular de una alteración de señal en los estudios de RM potenciados en difusión no se conoce con exactitud. Se han observado casos en los que la zona identificada como infartada en los estudios de RM puede revertirse parcial o totalmente horas después de la oclusión tras una reperfusión inducida o espontánea. Esto sugiere que las alteraciones precoces en el coeficiente de difusión aparente medido en las secuencias de difusión no permiten definir de forma infalible el destino de un área isquémica<sup>15-18</sup>. Por otro lado, se ha observado que una reducción de flujo en imágenes de RM de perfusión no supone siempre una alteración del aporte tisular de oxígeno<sup>19</sup>. Por ello, la definición de la zona de penumbra en los estudios experimentales no puede extrapolarse directamente a los estudios clínicos; asimismo, la delimitación espacio-temporal del volumen de tejido potencialmente recuperable tras un ictus puede ser muy variable en cada paciente por múltiples factores anatómicos, fisiológicos y biomoleculares, lo que no permite una reproducibilidad inmediata de los resultados terapéuticos obtenidos en condiciones de laboratorio.

### Los mecanismos de muerte celular y la importancia de las mitocondrias

Frente al concepto tradicional de que las neuronas sometidas a un déficit del aporte de oxígeno y sustratos energéticos mueren exclusivamente por necrosis, actualmente se sabe que en la isquemia cerebral coexisten la muerte por necrosis y la muerte por apoptosis —siendo esta última además la predominante en la zona de penumbra<sup>20</sup>. El descubrimiento de que la muerte por apoptosis se produce mayoritariamente a las 24-48 h del daño isquémico<sup>21</sup> abrió la posibilidad de nuevas dianas terapéuticas. Estudios experimentales realizados en ratones genéticamente modificados y deficientes en caspasa 3 (un tipo de enzima implicada en la vía final de apoptosis) o en receptor del factor de necrosis tumoral (una superfamilia de receptores que regulan la activación de caspasas) han mostrado que estos animales son más resistentes al daño isquémico. Sin embargo, estos hallazgos no se han corroborado en otros modelos de isquemia, probablemente por la contribución en el proceso de apoptosis de otras cascadas bioquímicas caspasa-independientes tales como las activadas por nucleasas mitocondriales<sup>22,23</sup> o por ciertas proteasas de tipo no-caspasa<sup>24</sup>. De hecho, el papel de las endonucleasas mitocondriales en la apoptosis está cobrando cada vez más importancia y se están buscando dianas mitocondriales para bloquear el *swelling* mitocondrial

que precede a la ruptura de estas organelas y la liberación al citosol de sus enzimas apoptóticas. El principal foco de atención es el poro de transición de la membrana mitocondrial, un canal ensamblado entre la membrana interna y la externa de la mitocondria cuya apertura puede bloquearse con fármacos como la ciclosporina A, con la que se han obtenido resultados muy prometedores tanto en daño cerebral traumático como isquémico<sup>25,26</sup>.

## La importancia de las células gliales en el daño isquémico

Clásicamente los estudios de isquemia cerebral se han focalizado en el efecto de la isquemia sobre las neuronas. Sin embargo, se está reconociendo en las últimas dos décadas el papel esencial desempeñado por las células gliales tanto en la progresión como en la recuperación del daño cerebral isquémico<sup>27</sup>. Actualmente también está en duda el clásico dogma de la resistencia superior de las células gliales a las condiciones de isquemia. Aunque los estudios iniciales realizados *in vitro* sobre cultivos de células gliales mostraron que los astrocitos eran comparativamente más resistentes al daño isquémico que las neuronas<sup>28</sup>, estudios realizados en condiciones *in vivo* han mostrado que la muerte de los astrocitos puede incluso preceder a la muerte neuronal<sup>10</sup>. Por otro lado, tras identificarse en los años 70 la compleja organización tridimensional de los astrocitos a través de uniones intercelulares de tipo gap, no está claro todavía si la comunicación entre células de glia a través de estas uniones resulta beneficiosa o perjudicial tras un daño isquémico. Algunos investigadores sugieren que las uniones de tipo gap pueden propagar y amplificar el daño, y proponen que este mecanismo podría explicar la muerte neuronal observada en zonas lejanas al territorio vascular ocluido<sup>29,30</sup>. Sin embargo, otros estudios recientes realizados *in vivo* respaldan el efecto beneficioso de las uniones gap en la supervivencia de las neuronas tras un daño isquémico. Ratones genéticamente deficientes en conexina-43 (proteína elemental en la estructura de las uniones gap) sufren infartos de mayor volumen que los ratones normales<sup>31-33</sup>. Por otro lado, la causa más frecuente de muerte en los pacientes que han sufrido un infarto maligno es el edema citotóxico o celular, que se desarrolla fundamentalmente en los astrocitos, por ser éstas las células encargadas del aclaramiento de K<sup>+</sup> y glutamato del medio extracelular<sup>34,35</sup>. Recientemente ha surgido una gran expectación en torno al papel desempeñado por la acuaporina 4 (AQP4) -el principal canal de intercambio de agua en los astrocitos- tras observarse que el grado de edema asociado a un infarto cerebral es significativamente menor tanto en ratones deficientes en AQP4<sup>36</sup> como en aquellos carentes de  $\alpha$ -sintropina, la proteína encargada del anclaje de la AQP4 a la membrana celular<sup>37</sup>. Sin embargo, la posible manipulación genética o farmacológica de la expresión de AQP4 es un objetivo terapéutico de difícil consecución pues el papel fisiológico desempeñado por este canal de agua varía en función de la fase concreta de evolución del daño cerebral. Mientras que un aumento de la expresión de AQP4 parece resultar perjudicial en las fases iniciales del desarrollo del edema isquémico, contribuyendo en esta fase al incremento del edema, podría por el contrario resultar

beneficioso en las fases posteriores ayudando a la resolución del mismo<sup>38</sup>. Este es un ejemplo paradigmático de la complejidad de acción de una molécula (en este caso un canal) cuya activación o bloqueo puede resultar beneficioso o perjudicial en función de la fase temporal del proceso patológico.

Existe por otro lado una gran controversia sobre el papel de los astrocitos reactivos en la isquemia cerebral y especialmente sobre las consecuencias del desarrollo de una cicatriz glial tras un daño isquémico. Actualmente se tiende a considerar que la astrogliosis tiene aspectos positivos y negativos dependiendo de la fase temporal de evolución del daño cerebral<sup>39</sup>. En fases iniciales la cicatriz glial puede proporcionar múltiples beneficios, estabilizando el frágil tejido nervioso que ha sufrido un daño isquémico al evitar que neuronas inicialmente no dañadas se expongan a un ambiente con elevada concentración de glutamato y radicales libres<sup>40</sup>. Por otro lado, la barrera física de inhibición del crecimiento axonal que supone la cicatriz glial representa más que un obstáculo una propiedad esencial para preservar la citoarquitectura global del tejido cerebral, pues permitir el crecimiento axonal dentro de un ambiente caótico y metabólicamente inestable puede causar más daño que beneficio<sup>41</sup>. Alternativamente, diversos estudios recientes han mostrado que los astrocitos reactivos expresan receptores de endotelinas o de factor de crecimiento vascular endotelial, implicados en la modulación del desarrollo neuronal, el crecimiento axonal y la vasculogénesis<sup>42,43</sup>, que podrían facilitar la recuperación de la zona cerebral dañada.

## El concepto de daño por reperfusión

El daño adicional que se produce en el tejido isquémico cuando se recupera su flujo normal, sobre todo a expensas de la formación de radicales libres y de la apertura de la barrera hematoencefálica (BHE), ha sido un destacado tema de investigación desde la introducción de las terapias trombolíticas<sup>44</sup>. De hecho, recientemente se ha propuesto el uso sinérgico de agentes neuroprotectores y trombolíticos para tratar de aminorar los efectos dañinos de la reperfusión<sup>45-48</sup>. Entre los diversos efectos de los radicales libres se está dando especial relevancia a la activación de la enzima poli-ADPribosa-polimerasa (PARP1) en respuesta al daño oxidativo del ADN. Esta enzima, que se encarga de reparar el ADN dañado, consume al activarse el coenzima NAD<sup>+</sup>-necesario para producir ATP-, algo que agrava todavía más la crítica situación bioenergética del tejido nervioso sometido a isquemia<sup>49</sup>. De hecho, se han obtenido resultados muy prometedores con inhibidores de la enzima PARP en ratones sometidos a un daño cerebral isquémico<sup>50</sup>.

Otro de los efectos más importantes de la reperfusión es la rotura de la BHE y el edema vasogénico asociado a la misma, un foco de estudio muy interesante por sus posibles implicaciones terapéuticas. En animales con una oclusión transitoria de la arteria cerebral media durante 90 minutos, la BHE se abre justo al comenzar la reperfusión y luego permanece cerrada hasta pasadas 24-48 horas<sup>51</sup>. Se ha observado que la apertura de la BHE se debe

fundamentalmente al efecto de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP), que degradan las proteínas que forman la estructura de las uniones estrechas entre las células endoteliales y las proteínas de la lámina basal. Animales genéticamente modificados deficientes en un tipo de MMP (la isoforma MMP-9) muestran menor daño de la BHE y presentan infartos de menor tamaño en modelos experimentales de isquemia<sup>52</sup>. Una vez más, la modulación farmacológica de las MMP no es sencilla, puesto que a pesar de su efecto perjudicial inicial, son enzimas que contribuyen de forma importante en la fase de recuperación, facilitando la angiogénesis y neurogénesis<sup>53</sup>.

## El daño de sustancia blanca y la regeneración axonal en la isquemia

Otro factor fundamental a tomar en consideración en el daño cerebral isquémico son las diferentes respuestas fisiopatológicas de la sustancia gris y la sustancia blanca, cuyas características estructurales y funcionales son radicalmente diferentes<sup>29</sup>. A pesar de que ambas son esenciales para el funcionamiento normal del cerebro, la mayoría de los estudios de isquemia cerebral se han centrado exclusivamente en la sustancia gris. Sin embargo, el daño de la sustancia blanca es un factor que probablemente contribuye significativamente a los pobres resultados obtenidos en la mayoría de los ensayos clínicos. La pobreza del aporte vascular colateral a nivel de la sustancia blanca la hace especialmente vulnerable a la disminución del FSC. A nivel de la sustancia blanca, los dos elementos estructurales fundamentales son los axones de las neuronas y los oligodendrocitos, células gliales responsables de la mielinización y función normal de los axones. El déficit energético induce la liberación de calcio desde las organelas axonales, que puede conducir a una pérdida de la homeostasis iónica y de la función fisiológica de transporte axonal<sup>54</sup>.

Respecto a los oligodendrocitos, se ha observado que estas células son muy vulnerables a la isquemia *in vivo*, y su daño está mediado fundamentalmente por los receptores de glutamato de tipo AMPA<sup>55,56</sup>. La alteración de la síntesis de mielina por los oligodendrocitos es un factor fundamental del daño isquémico, e incluso en ausencia de muerte celular la disfunción metabólica de los oligodendrocitos impide la remielinización de los axones. El obstáculo al crecimiento axonal se debe no sólo a la cicatriz glial, sino al efecto inhibitorio de ciertos componentes de la mielina<sup>57</sup>. Es muy complicado que se pueda conseguir en un futuro estimular la regeneración axonal en un tejido dañado, ya que los axones en crecimiento requieren una estructura tridimensional de la mielina en forma de túnel capaz de guiar el avance longitudinal de los conos de crecimiento axónico<sup>58,59</sup>. Sólo se ha observado crecimiento axonal en tractos parcialmente denervados, donde los túneles mielinizados y el esqueleto asociado de astroglia ha sobrevivido<sup>41</sup>. Entender mejor los mecanismos que conducen a la muerte de los oligodendrocitos y su interacción con los axones puede ayudar a buscar nuevas terapias para el tratamiento de la isquemia cerebral.

## El efecto de la plasticidad cerebral en la recuperación funcional tras un daño isquémico

La mayoría de los genes y proteínas implicados en el crecimiento neuronal, sinaptogénesis y proliferación de espinas dendríticas tienen su máxima expresión durante el desarrollo precoz del cerebro y disminuyen significativamente con la edad<sup>60</sup>. Datos recientes sugieren un gran paralelismo entre los mecanismos de plasticidad en el tejido nervioso en desarrollo y los que tienen lugar en el cerebro adulto que ha sufrido un infarto<sup>61,62</sup>. La plasticidad cerebral en adultos que han sufrido un infarto se basa en diferentes grados de compensación proporcionados por dos mecanismos básicos: a) la sorprendente cantidad de conectividad difusa y redundante que existe en el cerebro y que permite esculpir nuevos circuitos en función de su actividad; b) la formación de nuevos circuitos funcionalmente activos entre regiones corticales no dañadas estructuralmente, fenómeno conocido como "remapping"<sup>63</sup>. Sin embargo, la capacidad de remodelación de un cerebro que ha sufrido un infarto, en un paciente adulto y normalmente hipertenso, es menor que la de un cerebro en desarrollo, debido al daño de la microvascularización, la inflamación crónica y otros procesos que dificultan la plasticidad. A pesar de las limitaciones del cerebro adulto, se ha observado un período temporal concreto tras un infarto cerebral en el que hay un aumento de la expresión de los genes implicados en la plasticidad cerebral<sup>64</sup>. Tras un infarto de tamaño pequeño la recuperación funcional depende fundamentalmente del tejido perilesional, que asume funciones similares a las del tejido dañado<sup>62</sup>, mientras que tras un infarto de tamaño grande, el tejido con una capacidad funcional similar puede encontrarse sólo en áreas distantes o incluso en el hemisferio contralateral<sup>65</sup>. Se ha demostrado en estudios realizados en ratas que existe un período crítico para la recuperación y que si la rehabilitación se demora excesivamente la mejoría es significativamente menor<sup>66</sup>. Actualmente existe un gran interés para prolongar la ventana de tiempo durante la que están aumentados los procesos de neuroplasticidad que caracterizan la fase semiaguda tras un infarto<sup>63</sup>.

## Factores que dificultan la reproducibilidad clínica de los resultados terapéuticos obtenidos en el ámbito experimental

A pesar de los importantes conocimientos sobre la isquemia cerebral proporcionados por los estudios realizados en modelos experimentales, el fracaso de las diversas terapias neuroprotectoras que se habían mostrado eficaces en estudios experimentales ha producido una enorme decepción<sup>67</sup>. Hay multitud de factores que pueden contribuir a la disparidad de resultados entre estudios experimentales y clínicos. En primer lugar, a nivel macroscópico llama la atención que las ratas y los ratones poseen un cerebro lisencefálico. Debería considerarse la posibilidad de investigar el efecto de las terapias en animales superiores girencefálicos antes de dar el salto a los ensayos clínicos. Otra diferencia evidente es que los animales empleados suelen ser jóvenes y sin comorbilidades. En la última década se ha propuesto el uso de

animales ancianos y con enfermedades asociadas -obesidad, hipertensión o diabetes-, con el objetivo de que reproduzcan mejor la enfermedad humana<sup>19,68</sup>. Otro factor a analizar es la diferencia en el modo de evaluar el efecto de las terapias; pues mientras que los estudios experimentales suelen cuantificar la necrosis celular postisquemia, los estudios clínicos valoran el pronóstico funcional de los pacientes. Finalmente queremos llamar la atención sobre el gran número de fármacos que han sido probados en ensayos clínicos sin haber demostrado resultados suficientemente sólidos en modelos experimentales. Muchos de los agentes ensayados en el ámbito clínico habían mostrado tan sólo un efecto modesto en los estudios experimentales, sin que se remarcará la significativa variabilidad existente. Tomemos a modo de ejemplo lo que ha sucedido con el nimodipino, un agente neuroprotector que bloquea los canales de calcio y sobre el que se han realizado un gran número de estudios. Por un lado, de los más de 250 estudios experimentales sólo 20 eran estudios controlados en los que el fármaco se administró tras la inducción de la isquemia. De esos 20, sólo la mitad de los trabajos mostraron que el nimodipino tenía un efecto positivo, habiéndose administrado el fármaco en la mayoría de ellos durante los primeros 15 minutos tras inducir la isquemia<sup>69</sup>. Sin embargo, frente al beneficio limitado y la inconsistencia de los resultados, se han realizado más de diez ensayos clínicos, cinco de ellos randomizados y doble ciego<sup>70-74</sup>. Además, resulta llamativo que los pacientes recibieron el fármaco a las 24-48 h del inicio de los síntomas, es decir transcurrido un periodo de tiempo muy superior a la ventana terapéutica identificada en los estudios experimentales. Parece que la presión de las compañías farmacéuticas para iniciar ensayos clínicos sin unos sólidos resultados experimentales puede ser un factor implicado en los fracasos terapéuticos observados en los pacientes. Existe asimismo un sesgo importante al no publicarse o hacerse en formatos cortos aquellos trabajos experimentales con resultados negativos. Obviar la complejidad del cerebro es probablemente el error más común en el diseño de ensayos de terapias dirigidas a las diversas patologías que afectan a este extraordinario órgano.

La terapia con células madre es uno de los campos que más rápidamente está avanzando en los últimos años y se ha promocionado como la gran esperanza para la reparación del daño isquémico cerebral<sup>75,76</sup>. La terapia con células madres se ideó inicialmente como una terapia de reemplazamiento celular para reconstruir los circuitos cerebrales dañados y poder recuperar las funciones perdidas. Sin embargo, ni el implante de células madre ni la estimulación de la neurogénesis en mamíferos son una garantía para aumentar el número de neuronas funcionales, ya que para ello es imprescindible que se integren sinápticamente dentro de un circuito cerebral. Quizás se han creado demasiadas expectativas puesto que el objetivo final de estas terapias es sumamente ambicioso. La reparación de un tejido con células madre requiere de dos procesos independientes: a) las células muertas deben reemplazarse por otras nuevas generadas; b) las células nuevas deben diferenciarse y organizarse en un patrón complejo que idealmente restaurará la estructura original del tejido. Resulta evidente que dada la reducida capacidad del tejido nervioso adulto para la sustitución celular endógena y la dificultad de restablecimiento de conexiones neuronales ordenadas a larga distancia, es aún prematuro crear expectativas acerca de la terapia

celular como panacea para la recuperación de las lesiones cerebrales de origen isquémico<sup>77</sup>. Hasta el momento se han implantado directamente en el cerebro o administrado por vía sistémica una gran variedad de tipos celulares, incluyendo células madre neuronales, trasplantes fetales, células de líneas inmortalizadas o células de médula ósea<sup>78</sup>. El uso de células exógenas es complejo y se desconocen los factores que a nivel molecular controlan la migración, diferenciación y conectividad de estas células. Por ello el uso de precursores endógenos está atrayendo cada vez más interés. En los años 70 se abolió el dogma de que el cerebro de mamífero adulto no puede repararse a sí mismo gracias al descubrimiento de la neurogénesis, fenómeno que consiste en el nacimiento de neuronas nuevas en cerebros adultos. Sin embargo, el grado de neurogénesis posnatal disminuye conforme aumenta la complejidad cerebral<sup>79</sup>. Sólo se ha observado que la neurogénesis persiste a nivel de la zona subgranular del giro dentado del hipocampo y en la zona subventricular en los mamíferos adultos<sup>80</sup>. Estudios experimentales han demostrado que la neurogénesis se activa tanto en el hipocampo de ratas y primates<sup>81,82</sup> como a nivel cortical en roedores adultos en los que se induce un daño cerebral isquémico<sup>83,84</sup>. Sin embargo, la mayoría de las nuevas neuronas mueren y sólo algunas son capaces de migrar al tejido dañado. La microreparación cerebral resultante no parece ser suficiente para revertir un déficit funcional. Por esta razón, los proyectos más recientes tratan de estimular con factores de crecimiento el fenómeno fisiológico de la neurogénesis, un procedimiento no exento de riesgos. Por un lado, se ha visto que algunas formas de epilepsia son debidas a que las células madre neuronales realizan más divisiones que las que deberían y dan lugar a circuitos con una función aberrante<sup>85</sup>. Por otro lado, la administración de factores de crecimiento por encima de los niveles habituales del cerebro puede inducir la formación de tumores cerebrales<sup>86</sup>. Finalmente, aunque todavía no está claro cuáles son los mecanismos que explican los beneficios observados a nivel experimental con el uso de terapias celulares, cada vez está más aceptada la idea de que sus efectos podrían deberse a la capacidad de estas células para liberar ciertas sustancias neuroprotectoras o inmunomoduladoras<sup>87</sup>. El elegante estudio publicado recientemente por Kolb et al<sup>88</sup>, que consistió en la estimulación farmacológica de la neurogénesis fisiológica tras la inducción de un infarto cortical y la posterior extirpación quirúrgica del área cortical regenerada, fue el primero en demostrar el efecto modulador de las células madre. Este trabajo mostró que las ratas empeoraron funcionalmente al séptimo día de extirpar la corteza regenerada pero curiosamente no en el primer día tras la cirugía. El hecho de que tuvieran que pasar varios días hasta objetivarse un empeoramiento neurológico sugiere que el tejido nervioso regenerado actúa como un promotor de la plasticidad o manteniendo la homeostasis en las áreas corticales adyacentes y no a través de una integración neurofisiológica efectiva en el área dañada.

En conclusión, creemos que el objetivo fundamental de los estudios realizados en modelos experimentales de isquemia cerebral ha de ser la obtención de conocimientos básicos acerca de los procesos patobiológicos subyacentes al daño isquémico. Su empleo no debería restringirse a la mera demostración de un beneficio terapéutico como fase previa a la realización de ensayos clínicos. Dichos ensayos no

deberían iniciarse con agentes terapéuticos cuyos beneficios hayan sido escasos o inconsistentes en los estudios experimentales. La isquemia cerebral supone la activación en paralelo de múltiples procesos fisiopatológicos que tienen lugar en el órgano más complejo del cuerpo humano y que interactúan entre sí temporalmente haciendo impredecible el pronóstico funcional del área afectada en cada individuo. Parece evidente que la adopción de enfoques de tipo reduccionista, centrados en procesos bioquímicos o moleculares concretos considerados de forma unívoca como beneficiosos o perjudiciales a lo largo de toda la evolución temporal del daño isquémico es insuficiente. El diseño de nuevos abordajes terapéuticos para la isquemia cerebral debe basarse en una integración previa del enorme volumen de conocimientos aportados por los modelos experimentales sobre la fisiopatología del daño cerebral isquémico, asumiendo la complejidad estructural y funcional del órgano que sufre dicho daño.

## Bibliografía

- García-Bonilla L, Rosell A, Torregrosa G, Salom JB, Alborch E, Gutiérrez M, et al. Guía de recomendaciones en la aplicación de modelos animales para el estudio del ictus. *Neurologia*. 2011;26:105–10.
- National Institute of Neurological Disorders, Stroke, rt-PA study group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 1995;333:1581–7.
- Bandera E, Botteri M, Minelli C, Sutton A, Abrams KR, Latronico N. Infarct core in acute ischemic stroke. A systematic review. *Stroke*. 2006;37:1334–9.
- Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. 1988;1:623–34.
- Siesjö BK. Historical overview. Calcium, ischemia and death of brain cells. *Ann NY Acad Sci*. 1988;522:638–61.
- Hossman K-A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol*. 1994;36:557–65.
- Astrup J, Siesjö B, Symon L. Threshold in cerebral ischemia – the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981;12:723–5.
- Jones TH, Morawetz RB, Crowell RM, Marcoux FW, FitzGibbon SJ, DeGirolami U, et al. Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J Neurosurg*. 1981;54:773–82.
- Back T, Zhao W, Ginsberg MD. Three-dimensional image-analysis of brain glucose metabolism/blood flow uncoupling and its electrophysiological correlates in the acute ischemic penumbra following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995;15:566–77.
- Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang ZG, Lian J, et al. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol*. 1993;142:623–35.
- Kidwell CS, Alger JR, Saver JL. Beyond mismatch. Evolving paradigms in imaging the ischemic penumbra with multimodal magnetic resonance imaging. *Stroke*. 2003;34:2729–35.
- Wardlaw JM. Neuroimaging in acute ischaemic stroke: insights into unanswered questions of pathophysiology. *J Intern Med*. 2010;267:172–90.
- Moseley ME, de Crespigny A, Spielman DM. Magnetic resonance imaging of human brain function. *Surg Neurol*. 1996;45:385–91.
- Kloska SP, Wintermark M, Engelhorn T, Fiebich JB. Acute stroke magnetic resonance imaging: current status and future perspective. *Neuroradiology*. 2010;52:189–201.
- Oppenheim C, Stanescu R, Dormont D, Crozier S, Marro B, Samson Y, et al. False-negative diffuse diffusion-weighted MR findings in acute ischemic stroke. *Am J Neuroradiol*. 2000;21:1434–40.
- Li F, Silva MD, Liu KF, Helmer KG, Omae T, Fenstermacher JD, et al. Secondary decline in apparent diffusion coefficient and neurological outcomes after a short period of focal brain ischemia in rats. *Ann Neurol*. 2000;48:236–44.
- Kidwell CS, Saver JL, Mattiello J, Starkman S, Vinuela F, Duckwiler G, et al. Thrombolytic reversal of acute human cerebral ischemic injury shown by diffusion/perfusion magnetic resonance imaging. *Ann Neurol*. 2000;47:269–462.
- Fiehler J, Kucinski T, Knudsen K, Rosenkranz M, Thomalla G, Weiller C, et al. Are there time-dependent differences in diffusion and perfusion within the first 6 hours after stroke onset? *Stroke*. 2004;35:2099–104.
- Hossman K-A. Cerebral ischemia: Models, methods and outcomes. *Neuropharmacology*. 2008;55:257–70.
- Ginsberg MD. The new language of cerebral ischemia. *AJNR*. 1997;18:1435–45.
- Graham SH, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21:99–109.
- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombas C, Bowers WJ, Federoff HJ, et al. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*. 2002;297:259–63.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. 2007;87:99–163.
- Blomgren K, Zhu C, Wang X, Karlsson JO, Leverin AL, Bahr BA, et al. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem*. 2001;276:10191–8.
- Matsumoto S, Friberg H, Ferrand-Drake M, Wieloch T. Blockade of the mitochondrial permeability transition pore diminishes infarct size in the rat after transient middle cerebral artery occlusion. *Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19:736–41.
- Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10:481–94.
- Perea TD, Coplan JD, Lisanby SH, Lipira CM, Arif M, Carpio C, et al. Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates. *J Neurosci*. 2007;27:4894–901.
- Juurink BH, Hertz L, Yager JY. Astrocyte maturation and susceptibility to ischaemia or substrate deprivation. *NeuroReport*. 1992;2:1135–7.
- Siesjö BK, Wieloch T, editors. Cellular and molecular mechanisms of ischemic brain damage. Vol 71, *Advances in Neurology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996.
- Anderson MF, Blomstrand F, Blomstrand C, Eriksson PS, Nilsson M. Astrocytes and stroke: networking for survival? *Neurochem Res*. 2003;28:293–305.
- Siushansian R, Bechberger JF, Cechetto DF, Hachinski VC, Naus CC. Connexin 43 null mutation increases infarct size after stroke. *J Comp Neurol*. 2001;440:387–94.
- Nakase T, Söhl G, Theis M, Willecke K, Naus CC. Increased apoptosis and inflammation after focal brain ischemia in mice lacking connexin 43 in astrocytes. *Am J Pathol*. 2004;164:2067–75.
- Perez Velazquez JL, Kokarvtesa L, Sarbaziha R, Jeyapalan Z, Leshchenko Y. Role of gap junctional coupling in astrocytic networks in the determination of global ischaemia-induced oxidative stress and hippocampal damage. *Eur J Neurosci*. 2006;23:1–10.
- Garcia JH, Kalimo H, Kamijyo Y, Trump BF. Cellular events during partial cerebral ischemia. I. Electron microscopy of feline cerebral cortex after middle-cerebral-artery occlusion. *Virchows Arch B Cell Pathol*. 1977;25:191–206.
- Liang D, Bhatta S, Gerzanich V, Simard JM. Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurg Focus*. 2007;22:E5.

36. Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med*. 2000;6:159–63.
37. Amiry-Moghaddam M, Xue R, Haug FM, Neely JD, Bhardwaj A, Agre P, et al. Alpha-Syntrophin deletion removes the perivascular but no endothelial pool of aquaporin-4 at the blood-brain barrier and delays the development of brain edema in an experimental model of acute hyponatremia. *FASEB J*. 2004;18:542–4.
38. Bloch O, Manley GT. The role of aquaporin-4 in cerebral water transport and edema. *Neurosurg Focus*. 2007;15:E3.
39. Rolls A, Shechter R, Schwartz M. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10:235–41.
40. Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MW. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2004;24:2143–55.
41. Raisman G. Myelin inhibitors: does NO mean GO? *Nature Rev Neurosci*. 2004;5:157–61.
42. Fagan SC, Hess DC, Hohnadel EJ, Pollock DM, Ergul A. Targets for vascular protection after acute ischemic stroke. *Stroke*. 2004;35:2220–5.
43. Eichmann A, Makinen T, Alitalo K. Neural guidance molecules regulate vascular remodelling and vessel navigation. *Genes Dev*. 2005;19:1013–21.
44. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signalling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21:2–14.
45. Andersen M, Overgaard K, Meden P, Boysen G, Choi SC. Effects of citicoline combined with thrombolytic therapy in a rat embolic stroke model. *Stroke*. 1999;30:1464–71.
46. Asahi M, Asahi K, Wang X, Lo EH. Reduction of tissue plasminogen activator-induced hemorrhage and brain injury by free radical spin trapping after embolic focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Meta*. 2000;20:452–7.
47. Lyden P, Jacoby M, Schim J, Albers G, Mazzeo P, Ashwood T, et al., for the CLASS IHT Investigators. The Clomethiazole Acute Stroke Study in Tissue-Type Plasminogen Activator –Treated Stroke (CLASS-T): final results. *Neurology*. 2001;57:1199–205.
48. Grotta J. Combination Therapy Stroke Trial: recombinant tissue-type plasminogen activator with/without lubezole. *Cerebrovasc Dis*. 2001;12:258–63.
49. Prieto R, Pascual JM, Tavazzi B, Taya K, Barrios L, Amorini AM, et al. Early metabolic alterations following a severe diffuse traumatic brain injury in rats as detected by HPLC: Importance of PARP-1 overactivation. *World Congress of Neurological Surgeons*. 2009.
50. Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, Traystman RJ, Bao J, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nature Med*. 1997;3:1089–95.
51. Yang GY, Betz AL. Reperfusion-induced injury to the blood brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 1994;25:1658–65.
52. Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH. Role of matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and exime inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20:1681–9.
53. Rosenberg GA, Yang Y. Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus*. 2007;22:E4.
54. Coleman M. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6:889–98.
55. Pantoni L, Garcia JH, Gutierrez JA. Cerebral White matter is highly vulnerable to ischemia. *Stroke*. 1996;27:1641–6.
56. McDonald JW, Althomsons SP, Hyrc KL, Choi DW, Goldberg MP. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/Kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Med*. 1998;4:291–7.
57. Xie F, Zheng B. White matter inhibitors in CNS axon regeneration failure. *Exp Neurol*. 2008;209:302–12.
58. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med*. 2002;8:963–70.
59. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5:146–56.
60. Hattiangady B, Rao MS, Shetty GA, Shetty AK. Brain-derived neurotrophic factor phosphorylated cyclic AMP response element binding protein and neuropeptide Y decline as early as middle age in the dentate gyrus and CA1 and CA3 subfields of the hippocampus. *Exp Neurol*. 2005;195:353–71.
61. Brown CE, Li P, Boyd JD, Delaney KR, Murphy TH. Extensive turnover of dendritic spines and vascular remodelling in cortical tissues recovering from stroke. *J Neurosci*. 2007;27:4101–9.
62. Brown CE, Aminoltejeri K, Erb H, Winship IR, Murphy TH. In vivo voltage-sensitive dye imaging in adult mice reveals that somatosensory maps lost to stroke are replaced over weeks by new structural and functional circuits with prolonged modes of activation within both the peri-infarct zone and distant sites. *J Neurosci*. 2009;29:1719–34.
63. Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10:861–72.
64. Carmichael ST, Archibeque I, Luke L, Nolan T, Momiy J, Li S. Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex. *Exp Neurol*. 2005;193:291–311.
65. Takatsuru Y, Fukumoto D, Yoshitomo M, Nemoto T, Tsukada H, Nabekura J. Neuronal circuit remodelling in the contralateral cortical hemisphere during functional recovery from cerebral infarction. *J Neurosci*. 2009;29:10081–6.
66. Biernaskie J, Chernenko G, Corbett D. Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. *J Neurosci*. 2004;24:1245–54.
67. Dirnagl U. Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26:1465–78.
68. Crossley NA, Sena E, Goehler J, Horn J, van der Worp B, Bath PM, et al. Empirical evidence for bias in the design of experimental stroke studies. A metaepidemiologic approach. *Stroke*. 2008;39:929–34.
69. Horn J, de Haan RJ, Vermeulen M, Luiten PG, Limburg M. Nimodipine in animal model experiments of focal cerebral ischemia: a systematic review. *Stroke*. 2001;32:2433–8.
70. TRUST Study Group. Randomised, Double-blind, placebo-controlled Trial of nimodipine in acute stroke. *Trust Study Group*. *Lancet*. 1990;336:1205–9.
71. American Nimodipine Study Group. Clinical trial of nimodipine in acute ischemic stroke. The American Nimodipine Study Group. *Stroke*. 1992;23:3–8.
72. Kaste M, Fogelholm R, Erila T, Palomaki H, Murros K, Rissanen A, et al. A randomized, Double-blind, placebo-controlled Trial of nimodipine in acute ischemic hemispheric stroke. *Stroke*. 1994;25:1348–53.
73. Wahlgren NG, MacMahon DG, De Keyser J, Indredavik B, Ryman T. Intravenous Nimodipine West European Stroke Trial (INWEST) of nimodipine in the treatment of acute ischaemic. *Stroke*. 1994;4:204–10.
74. Horn J, de Haan RJ, Vermeulen M, Limburg M. Very Early Nimodipine Use in Stroke (VENUS): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Stroke*. 2001;32:461–5.
75. Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, Meltzer C, Thulborn KR, Gebel J, et al. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology*. 2000;55:565–9.
76. Scharff C, Kim JR, Grossman M, Macklis JD, Nottebohm F. Targeted neuronal death affects neuronal replacement and vocal behaviour in adult songbirds. *Neuron*. 2000;25:481–92.

77. Rossi F, Cattaneo E. Neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3:401–9.
78. Burns TC, Verfaillie CM, Low WC. Stem cells for ischemic brain injury: a critical review. *J Comp Neurol.* 2009;515:125–444.
79. Rakic P. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3:65–71.
80. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci.* 2002;22:629–34.
81. Koketsu D, Furuichi Y, Maeda M, Matsuoka N, Miyamoto Y, Hisatsune T. Increased number of new neurons in the olfactory bulb and hippocampus of adult non-human primates after focal ischemia. *Exp Neurol.* 2006;199:92–102.
82. Zhang B, Wang RZ, Lian ZG, Song Y, Yao Y. Neurogenesis by activation of inherent neural stem cells in the rat hippocampus after cerebral infarction. *Chin Med. Sci J.* 2009;24:41–5.
83. Jiang W, Gu W, Brannstrom T, Rosqvist R, Wester P. Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 2001;32:1201–7.
84. Ohira K, Furuta T, Hiroki H, Nakamura KC, Kuramoto E, Tanaka Y, et al. Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells. *Nat Neurosci.* 2010;13:173–9.
85. Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL, Cross SD. Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol.* 2002;174:201–14.
86. Assanah M, Lochhead R, Ogden A, Bruce J, Goldman J, Canoll P. Glial progenitors in adult white matter are driven to form malignant gliomas by platelet-derived growth factor-expressing retroviruses. *J Neurosci.* 2006;26:6790–871.
87. Mattson B, Sorensen JC, Zimmer J, Johansson BB. Neural grafting to experimental neocortical infarcts improves behavioural outcome and reduces thalamic atrophy in rats housed in enriched but not in standard environment. *Stroke.* 1997;28:1225–31.
88. Kolb B, Morshead C, Gonzalez C, Kim M, Gregg C, Shingo T, et al. Growth factor-stimulated generation of new cortical tissue and functional recovery after stroke damage to the motor cortex of rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27:983–97.