

Activación de la neurogénesis en el hipocampo de ratón adulto por factores embrionarios



Tutora: María Isabel Alonso Revuelta

Alumna: Sandra Rodríguez Sáez

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
• HISTORIA DE LA NEUROGÉNESIS DEL CEREBRO ADULTO.....	3
• NICHOS NEUROGÉNICOS.....	3
• ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL HIPOCAMPO.....	4
• FORMACIÓN DE LAS NUEVAS NEURONAS.....	5
▪ TEORÍA CLÁSICA.	
▪ NUEVAS PROPUESTAS. VENTRÍCULO LATERAL E INFLUENCIA DE E-CSF.	
• MARCADORES NEURONALES.....	10
OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
• INTRODUCCIÓN.....	13
• MATERIALES.....	13
• OBTENCIÓN DE CSF-E DE EMBRIONES DE RATÓN.....	14
• ESTABILIZACIÓN Y ANESTESIA DE LOS ANIMALES DEL LABORATORIO.....	14
• OBTENCIÓN DEL TEJIDO CEREBRAL.....	15
• CULTIVO.....	15
• FIJACIÓN EN PARAFINA.....	17
• INMUNOCITOQUÍMICA.....	17
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIÓN.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30

INTRODUCCIÓN

HISTORIA DE LA NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO

Se puede definir la neurogénesis en el cerebro adulto como un proceso de generación de neuronas funcionales a partir de las células progenitoras, proceso que incluye la proliferación y diferenciación neuronal específica de los progenitores neuronales, además de la maduración e integración funcional de las neuronas en sus circuitos.

En la historia de la neurociencia, hasta la segunda mitad del siglo XX, se pensaba que la regeneración del sistema nervioso no era posible en un individuo adulto. En la década de los sesenta, Joseph Altman, utilizando la técnica de autorradiografía con timidina tritiada para marcar células en división, demostró la existencia de nichos neurogénicos en áreas del cerebro adulto. En la década de los 80, el avance notorio de la inmunohistoquímica, la citología y las técnicas moleculares sentaron la base de experimentos clave en la neurogénesis. En los años 90, Reynolds y Weiss aislaron en ratones adultos células con propiedades autoregenerativas en el cuerpo estriado. En la misma época, Lois y Álvarez-Buylla identificaron la zona subventricular (ZSV) del ratón como localización de precursores neuronales. Hacia finales de la década de los 90, se observó que la neurogénesis era un hecho extendido en mamíferos superiores, como primates y humanos. Utilizando bromodeoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina, el grupo de Fred Gage mostró que en el cerebro humano se observa neurogénesis en el giro dentado del hipocampo (ZSG), una zona de notable interés funcional por estar básicamente relacionada con la memoria reciente y el aprendizaje. En relación a la neurogénesis del hipocampo, diversos experimentos mostraron que ésta se encuentra incrementada por las condiciones ambientales y la ejecución de tareas motoras.

Los estudios arriba mencionados están basados en modelos animales. La neurogénesis en humanos está prácticamente probada, aunque todavía queda un largo camino que recorrer para establecer su significado funcional.

NICHOS NEUROGÉNICOS

Las regiones neurogénicas en cerebro adulto tienen dos características principales:

- Poseen células precursoras inmaduras a partir de las cuales se generan nuevas neuronas.
- Tienen un microambiente idóneo para que el proceso de la neurogénesis sea posible.

Se han descrito dos zonas principales responsables de la neurogénesis:

- **Zona subventricular (ZSV):** Adyacente a la pared del ventrículo lateral. Las células madre neurales (CMN) residen en la porción anterior de la ZSV y migran como neuroblastos a través de la banda migratoria rostral hacia el bulbo olfatorio donde se integran como interneuronas inhibitorias periglomerulares.
- **Zona subgranular del giro dentado del hipocampo (ZSG):** Las células madre neurales se encuentran en la capa subgranular, donde proliferan y se diferencian para luego integrarse en la capa granular donde maduran hasta convertirse en neuronas excitatorias.

Además de estas dos regiones, existen evidencias sobre la generación de neuronas en otras áreas del cerebro adulto, incluyendo neocórtex, amígdala y el hipotálamo, aunque ha habido controversia respecto al carácter neurogénico de estas zonas.

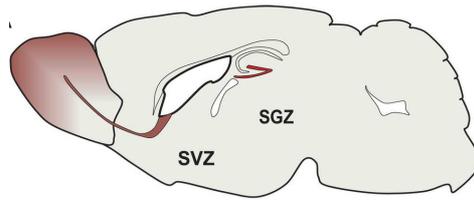


Figura 1: Localización de los dos nichos neurogénicos, actualmente tipificados y su relación con los ventrículos laterales.

En este trabajo se abordará, como modelo de nicho neurogénico, la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (ZSG).

ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL HIPOCAMPO

El hipocampo, en humanos, está localizado en la parte medial del lóbulo temporal del cerebro. Pertenecce, junto con el hipotálamo y la amígdala, al circuito límbico del cerebro, implicado en funciones afectivas y de memoria reciente. Por otra parte, el hipocampo pertenece a la arcuocorteza que, junto con el subículo y el giro dentado, componen la formación hipocámpica.

En ratón, el hipocampo está ubicado más superficialmente que en humano y es mucho más accesible. En la figura 2 se muestra la posición del hipocampo en el cerebro de ratón.



Figura 2. Sección del hipocampo en el cerebro de ratón adulto. Hipocampo de ratón teñido con la técnica de Nissl (azul de toluidina). Se pueden ver las dos grandes áreas en las que se organiza el Hipocampo la Fascia dentada (DG), el cual presenta, en la rata una característica forma de "v"; y el Asta de Ammon (CA), el cual, a su vez, se subdivide en cuatro zonas CA1, CA2, CA3 y CA4, y que además se imbrica con la Fascia Dentada a nivel de la CA4. También se pueden ver zonas adyacentes al Hipocampo como el Subiculum.

En cuanto a la formación hipocámpica como tal, está compuesta por las siguientes estructuras: (Tesis Laura Domínguez Escribà. Universidad de Valencia 2009) (Ver esquema adjunto)

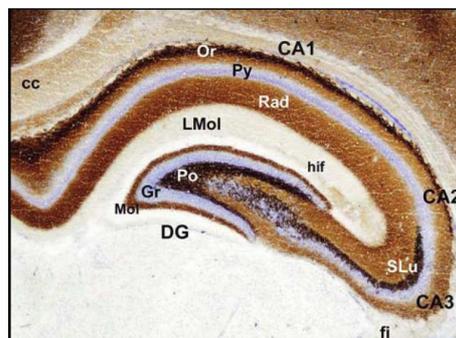


Figura 3. Microfotografía de una sección cerebral del hipocampo de ratón, teñido por la doble tinción de Timm-Nissl. En las regiones CA1-CA3 se identifican una serie de estratos celulares y fibrosos: *oriens* (Or), *piramidal* (Py), *radiatum* (Rad) y *lacunosum moleculare* (LMol). Únicamente, en la CA3, hay otra capa denominada *stratum lucidum* (SLu). En el giro dentado, justo por debajo de la fisura hipocámpica (hif), vemos la capa molecular (Mol), y hacia el interior la capa de células granulares (Gr), seguida de la capa polimorfa (Po). fi, fimbria; cc, *corpus callosum*. (figura extraída de Amaral y Witter, 1989).

- **Giro dentado:** Formado por una capa de somas pequeños densamente empaquetados en columnas (*stratum granulare*), donde residen las células granulares. Estas neuronas son de naturaleza glutamatérgica y poseen axones basales denominados fibras musgosas. En la capa más cercana a la fisura hipocámpica *stratum moleculare* o capa molecular, se localizan las prolongaciones dendríticas apicales de las neuronas granulares, algunas interneuronas y células gliales. La capa más profunda del giro dentado, designada *hilus*, se caracteriza por su naturaleza polimórfica, compuesta por una gran variedad de tipos celulares. Entre el *stratum granulare* y el *hilus* se pueda distinguir una fina capa, la capa subgranular, compuesta por precursores neurales que poseen actividad neurogénica durante la vida adulta.

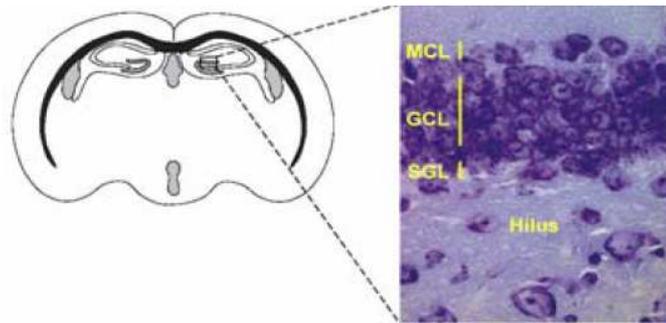


Figura 4. Sección coronal de cerebro de roedor adulto, donde se destaca el Hipocampo y se muestra una ampliación de las capas que pueden observarse en el giro dentado (DG)

- **El hipocampo propio o cuerno de Amón** está dividido en tres áreas: CA1 (*Cuerno de Amón 1*), CA2 (*Cuerno de Amón 2*) y CA3 (*Cuerno de Amón 3*). La zona más distal, designada CA1, se caracteriza por estar formada por células piramidales pequeñas, mientras la zona más proximal, formada por la CA2 y CA3, es rica en células piramidales de mayor tamaño. Las distintas áreas están estratificadas. Así, en la capa más interna encontramos un estrato rico en fibras, el *alveus* o sustancia blanca. Luego, encontramos una capa estrecha, el *stratum oriens* (*Or*), formada esencialmente por las dendritas basales de las células piramidales, que conforman el *stratum piramidale* (*Py*), de naturaleza glutamatérgica. A continuación, encontramos el *stratum radiatum* (*Rad*), formado por las dendritas apicales de las neuronas piramidales. En la parte más exterior (cerca a la fisura hipocámpica) encontramos el *stratum lacunosum moleculare* (*LMol*), que contiene las ramificaciones más distales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Únicamente en el área CA3, entre los *stratum piramidale* y *radiatum*, es posible encontrar un estrecho estrato acelular, formado por las dendritas apicales de las piramidales de CA3 y en el cuál se establecen conexiones con las fibras musgosas procedentes del giro dentado, el *stratum lucidem* (*SLu*).
- La **corteza entorrinal** se encuentra dividida en seis capas corticales bien definidas. Las capas II y III están densamente pobladas por pequeñas células que envían sus axones hacia el hipocampo. Las capas V y VI están formadas por neuronas grandes que envían sus proyecciones fuera de la formación hipocámpica. Las capas I y IV son acelulares.

FORMACIÓN DE NUEVAS NEURONAS

TEORÍA CLÁSICA

Durante mucho tiempo se ha intentado dilucidar si las células troncales embrionarias que originan las neuronas son los mismos que originan las células troncales en el cerebro adulto, dado que éstas últimas no conservan la pluripotencialidad de las células primeras. Las células troncales de las que derivan las neuronas generadas en el cerebro adulto pierden su

pluripotencialidad adquiriendo sólo la capacidad de generar sólo determinados tipos celulares (multipotencialidad) (Fig. 5. A)

Un tema que ha generado gran interés es determinar si las células troncales adultas provienen del mismo tipo de células neuroepiteliales que las células troncales embrionarias. Se ha visto que las células ubicadas en el entorno neuroepitelial adulto, tales como células de la glía radial o células endoteliales, están implicadas en procesos neurogénicos y son, probablemente, los precursores de las células troncales adultas, equivalentes a las embrionarias pero dan lugar, quizá, a un tipo de célula más diferenciado que las embrionarias. Por lo tanto, las neuronas generadas en el cerebro adulto provienen del mismo linaje que las neuronas embrionarias aunque son más específicas.

De las células troncales multipotentes se derivan los progenitores neurales, esto es, con capacidad para originar tanto progenitores neuronales, que darán lugar a neuronas adultas, como a progenitores gliales, que originarán células de la glía. Diversos estudios apuntan que los progenitores neurales, en estadios tempranos del desarrollo, se diferencian con mayor prevalencia en progenitores neuronales (Fig. 5. B). En estadios más tardíos originarían células de la glía. En el cerebro adulto ocurre lo contrario. El microambiente cerebral induciría a los progenitores neurales a diferenciarse a células de la glía mayoritariamente en detrimento de los progenitores neuronales.

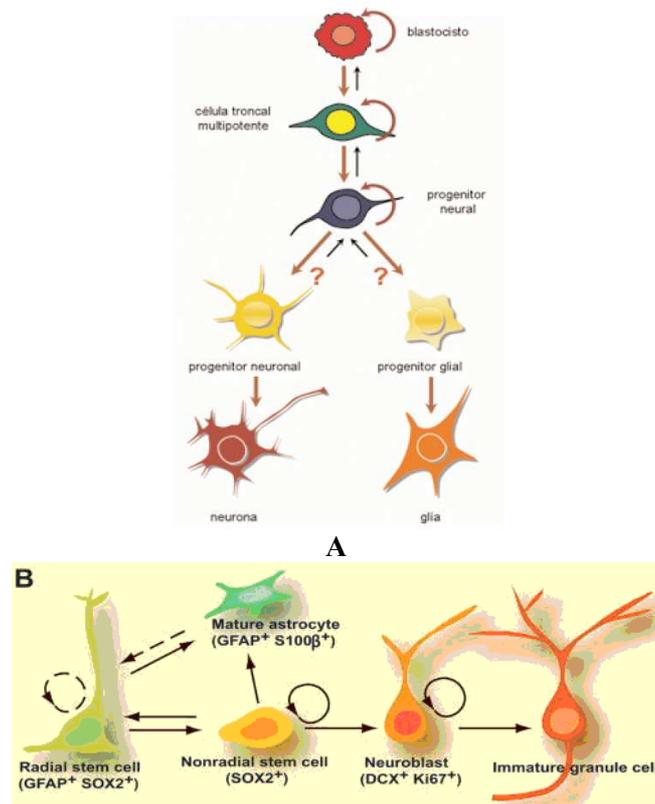


Figura 5. A. Células troncales con potencial capacidad neurogénica. La figura muestra, en orden jerárquico, las células troncales que en los mamíferos pueden dar origen a neuronas. (Arias-Carrión. O. 2007) B. Esquema de los posibles precursores neuronales. Según la teoría clásica, las neuronas jóvenes provienen de la glía radial, que se autoregeneran (círculo discontinuo), regenerando el nicho de células madre. Éstas, a su vez, pueden generar precursores neurales no radiales o bien astrocitos, que pueden generar glía radial. A partir de la glía radial se generarían los neuroblastos y las células granulares inmaduras.

En el giro dentado del hipocampo, concretamente en la capa subgranular, se originan las células progenitoras neurales (CPN), que darán lugar, como se ha visto, a las células de la glía y a las neuronas. Se han realizado diversos estudios en los que se afirma que estos precursores migran hacia la capa granular para formar neuronas maduras, enviando sus axones a la zona CA3 del hipocampo y emitiendo dendritas hacia la capa molecular hasta contactar con las células granulares residentes allí con anterioridad, aproximadamente dos semanas después de la mitosis que las origina. Después de un corto período de tiempo, las neuronas son funcionales y ya han establecido contacto con otras neuronas, por lo que no pueden diferenciarse de las que residían allí con anterioridad.

Aproximadamente un cuarto de millón de neuronas se acumulan en esta zona al mes en un cerebro sano.

Para explicar mejor el proceso de diferenciación, primeramente se explicarán los tipos celulares que generan una neurona adulta (Fig. 6):

- **Las células tipo B (astrocitos):** Tienen la capacidad de autorrenovación, por lo que son consideradas como las células troncales neuronales. Su morfología es parecida a las células de la glía, con un citoplasma triangular, alargado o anguloso que alcanza la capa de células granulares. Puede diferenciarse en dos tipos según su orientación en la ZSG:
 - *Astrocitos radiales (rAs):* Células B GFAP⁺ (marcador de astrocitos inmaduros), positivos para la vimentina y para la proteína musashi, que se une al RNA específico de astrocitos así como para la nestina. Se localizan en la parte más interna, hacia el hilus. Tienen un cuerpo celular grande, redondeado, triangular o poligonal. Poseen una prolongación radial que crece en la capa molecular. Tienen más orgánulos, ribosomas y mitocondrias que el otro tipo de astrocitos.
 - *Astrocitos horizontales (hAs):* Son células B GFAP⁺ (marcador de astrocitos inmaduros), positivos para la vimentina y para la proteína musashi, que se une al RNA específico de astrocitos así como para S-100 β de unión a calcio. No tienen características de células troncales aunque conservan la actividad mitótica de los precursores neuronales. No poseen prolongación radial ya que se extienden en paralelo a ZSG teniendo prolongaciones secundarias hacia el hilus. Resultados experimentales indican que los astrocitos horizontales provienen de los astrocitos radiales. Son los precursores de los oligodendrocitos.
- **Las células tipo D:** PSA-NCAM⁺, positivas para Doblecortina (DCX) y GFAP. Células precursoras de las nuevas neuronas. Proviene de la división de las células tipo B (astrocitos radiales rAs). Aparecen en grupos de dos a cuatro células del mismo tipo. Hay tres subtipos diferentes según su estructura y morfología:
 - *Células D1:* Pequeñas y redondeadas. No tienen prolongaciones a lo largo de la ZSG.
 - *Células D2:* Tienen una prolongación corta pudiendo estar bifurcada. Hay tres tipos de este subtipo respecto a la capa granular: las células *D2v*, con su proyección orientada verticalmente, las de tipo *D2h*, cuya proyección es horizontal, es decir, paralela a la capa granular, y por último, las células *D2i*, con la prolongación invertida respecto a la capa granular, apuntando hacia el hilus.
 - *Células D3:* Poseen una prolongación radial hacia la capa molecular y unas prolongaciones más finas a modo de dendritas hacia el hilus. Algunos autores las definen como “*células progenitoras neuronales amplificadoras*”. Con frecuencia se marcan con BrdU, mostrando su actividad mitótica. De este modo, pueden observarse células marcadas con BrdU, agrupadas a lo largo de la capa SGZ, e incluso, algunos grupos de estas células se encuentran separadas de las células madre que las han originado tras la mitosis.
- **Las células tipo G (Neuronas Granulares):** Células G. PSA-NCAM⁺. Están situadas entre la ZSG y la capa granular. Redondeadas y con una agrupación dendrítica hacia la capa más

externa. Su axón se prolonga hasta la zona CA3. Poseen las características electrofisiológicas de neuronas diferenciadas (eléctricamente activas, generación de potenciales de acción excitatorios e inhibitorios, recibir y transmitir el impulso eléctrico, liberación de neurotransmisores...)

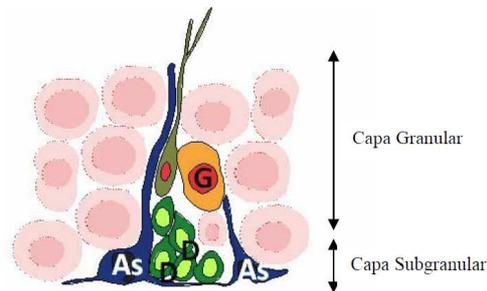


Figura 6. Organización y tipos celulares en la zona subgranular (ZSG). Esquema de una sección coronal del cerebro de ratón adulto en donde se muestra el giro dentado y los tipos celulares en la ZSG. Los astrositos de la ZSG. Las células azules corresponden a las células tipo B o astrositos (As, B), que al dividirse dan lugar a las células progenitoras D (verdes), que maduran dando lugar a nuevas células granulares G (rojas) (Arias-Carrión.O 2007).

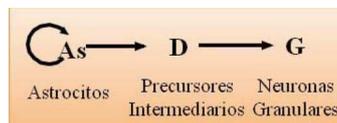


Figura 7. Estirpe celular de la SGZ (Imagen tomada de Seri *et al.*, 2004)

Las neuronas inmaduras migran desde la ZSG hasta la capa granular. Esta incorporación se produce durante el desarrollo de manera ordenada, es decir, las células más jóvenes ocupan regiones más profundas de esta capa mientras que neuronas más maduras ocupan los estratos más superficiales.

La diferenciación ocurre al mismo tiempo que la migración. Las células migratorias, aproximadamente 7 días después de la mitosis, emiten su axón hacia la zona CA3 situada en el asta de Ammón. Las dendritas crecen en dirección opuesta a los axones creciendo en un período de tiempo que abarca algunos meses (Fig. 8).

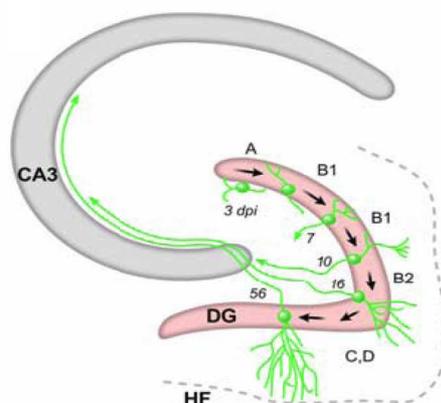


Figura 8. Estadios del crecimiento dendrítico. Se muestra el desarrollo del axón y el crecimiento dendrítico, siguiendo una clasificación temporal, definida por los autores basada en las observaciones hechas a partir del marcador DCX. Etapa A (0-3 días): polarización, migración y crecimiento axonal y dendrítico; Etapa B1 (3-11 días): crecimiento axonal y dendrítico principalmente; Etapa B2 (12-16 días): entrada de los axones a CA3; Etapa C (a partir del día 16): crecimiento de las espinas; Etapa D (a partir del día 56): modificación estructural de las espinas. (Las flechas a lo largo del DG, indican desplazamiento temporal y no espacial) (Imagen de Zhao *et al.*, 2006).

NUEVAS PROPUESTAS: VENTRÍCULO LATERAL E INFLUENCIA DEL E-CSF

Durante el período embrionario, el cerebro se desarrolla a partir de células neuroepiteliales, consideradas como los auténticos progenitores neurales. Durante el estadio de “tubo neural”, el extremo cefálico que dará lugar al encéfalo, es una cavidad ciega delimitada por neuroepitelio y llena de un fluido que, según estudios recientes, contiene proteoglicanos (CSPG), citoquinas (IL-1 β , IL-6), factores de crecimiento (FGF2, EGF...), ácido retinoico, vitaminas, etc.. (P. Martín. Tesis 1999. Universidad de Valladolid) que contribuyen a la expansión de las vesículas cerebrales en formación así como a la proliferación y diferenciación de las células progenitoras neurales. Este fluido cerebroespinal embrionario (CSF-E), está presente en todas las especies con algunas diferencias ontogénicas. Se sabe que la composición de E-CSF respecto al fluido cerebroespinal es diferente, siendo la concentración de proteínas mucho mayor en el período embrionario, produciéndose un drástico descenso en torno al nacimiento. Estos datos han sido relacionados con el hecho de que la proliferación y diferenciación neuronal sea mucho mayor durante el desarrollo embrionario que en la vida adulta. (Gato y Desmond. 2009)

Durante el período embrionario, dentro del esbozo cerebral tienen lugar diversos procesos, tales como migraciones celulares, proliferación y diferenciación celular en los cuales está implicado el CSF-E (Miyano et al. 2003, Gato et al 2005-2009, Alonso et al 2011). Los precursores neuroepiteliales tienen unas características específicas para asegurar el desarrollo de un cerebro viable. Estas características implican la supervivencia celular, la elevada actividad mitótica y la diferenciación hacia neuronas, que con el paso del tiempo decae. Este hecho se debe, en parte, a que, al cambiar con el nacimiento la composición de CSF-E y, por tanto, el microambiente neuroepitelial, las células neuroepiteliales no pueden activar los procesos de supervivencia, mitosis y diferenciación de manera adecuada y sólo prevalecen dos nichos actualmente tipificados comentados anteriormente (la zona subventricular ZSV y el giro dentado del hipocampo). Llegado este punto, cabe preguntarse si el CSF-E es capaz de inducir la proliferación y diferenciación de células progenitoras neurales en el cerebro adulto.

El hecho de que ambos nichos estén en contacto (ZSV) o cerca de (giro dentado del hipocampo) a los ventrículos laterales induce a pensar que puede haber una migración de células madre hacia estos nichos y que, al inducir estas células con CSF-E en sus inmediaciones, éste fluido pueda resultar un agente quimiotáctico potente para las células progenitoras de la estirpe neural. Hay diversos trabajos que apoyan esta hipótesis. Hay trabajos que indican que el CSF del ventrículo lateral de ratones adultos dirige el proceso de emigración de los precursores de la zona subventricular hacia el bulbo olfatorio (Sawamoto et al. 2006) Por extrapolación a estos trabajos se ha considerado la hipótesis de que en la zona del hipocampo puedan tener lugar los mismos procesos migratorios desde el ventrículo lateral en contraposición a la teoría clásica que afirma que los progenitores neurales de la zona hipocámpica están en los astrocitos de la glía radial localizados en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo.

En el hipocampo, según trabajos recientes, la generación de células progenitoras es compleja y se han tipificado dos poblaciones celulares.

- **Precursores quiescentes y precursores altamente proliferativos:** Localizados en la pared externa de la prolongación inferior del ventrículo lateral.
- **Precursores indiferenciados o neuronales:** Localizados en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo.

Puede existir un tránsito o emigración entre ambas localizaciones, desde la pared del ventrículo lateral al giro dentado del hipocampo como ya se ha descrito anteriormente. Este concepto es imprescindible para comprender la dinámica de las células madre del hipocampo (Figura. 9)

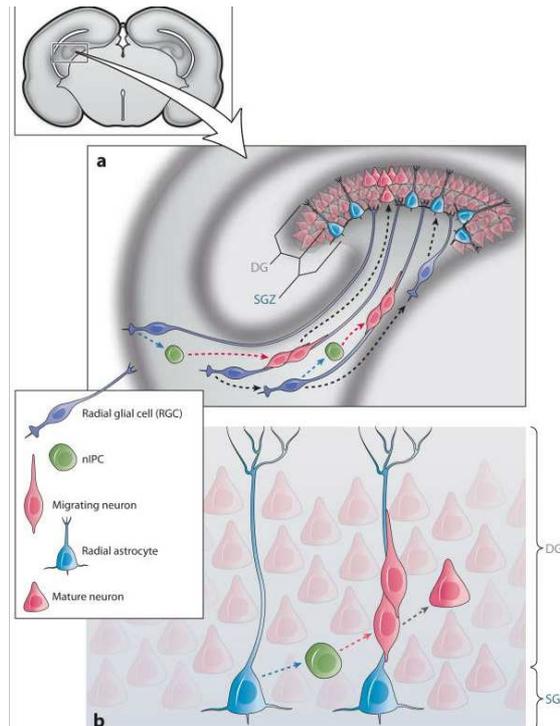


Figura. 9: Esquema de los tipos de progenitores y linajes en el giro dentado del hipocampo (DG) del cerebro adulto. La zona subgranular (SGZ) es la única región con capacidad neurogénica, ya que las células madre migran desde los ventrículos laterales (a). Los precursores neurales emigran desde el ventrículo lateral mientras continúa amplificándose el nicho de células madre. De los precursores neurales pueden diferenciarse células astrocíticas radiales, que llevan a cabo procesos importantes atravesando el DG. Los astrocitos radiales pueden generar progenitores neurales tipo D que a su vez pueden generar neuronas jóvenes. Las neuronas jóvenes siguen siendo estrechamente asociadas a los procesos radiales de los astrocitos radiales antes de diferenciarse en células granulares. Las flechas discontinuas indican la ruta de migración hipotética de las divisiones simétricas (rojo) y asimétricas (azul). Las flechas negras indican la transformación hipotética. El recuadro de la esquina superior izquierda muestra una sección transversal del prosencéfalo de roedor para ilustrar la ubicación de la circunvolución dentada del hipocampo. (KRIEGSTEIN, A, ÁLVAREZ-BUYLLA, A. (2009))

Estos estudios sobre la composición y función de CSF-E adquieren mayor importancia en su aplicación en el cerebro adulto. Muchas proteínas identificadas en CSF-E, desde donde ejercen sus efectos sobre la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células progenitoras neurales también se encuentran en CSF adulto, aunque muchas de éstas se hayan alteradas en afectados de enfermedades neurodegenerativas y neurológicas. Esto sugiere que algunas de las funciones de estas proteínas pueden mantenerse a lo largo de toda la vida. (David Bueno i Torrens. Departamento de genética. Facultad de biología. Universidad de Barcelona)

MARCADORES NEURONALES

Conforme, replicación, migración y diferenciación van teniendo lugar y la nueva neurona se va incorporando al lugar que ocupará permanentemente, va cambiando sus marcadores antigénicos externos (Fig 11). Así pues, se puede saber si una neurona o un precursor neuronal está en un estadio concreto marcando la misma, mediante inmunocitoquímica, con un anticuerpo concreto. En este trabajo se han empleado los siguientes marcadores:

- **BrdU:** Bromodeoxiuridina (Fig 10). Es un nucleósido sintético, análogo a la timidina, que se incorpora al DNA durante la síntesis. Marca las células en replicación. En este caso se ha utilizado como marcador para identificar a los precursores neurales (únicas células del cerebro adulto con capacidad de replicación) y además, el marcaje nuclear permanece en sus descendientes y permite localizarles.

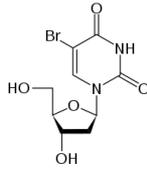


Fig 10. Estructura molecular de la bromodioxiuridina. La molécula es análoga a la timidina sustituyendo un grupo metilo por un bromo.

- **β -III-tubulina (Tuj1):** Es un marcador asociado a los microtúbulos de las neuronas jóvenes antes de que se inicie el proceso de diferenciación morfológica (emisión de neuritas y aplanamiento celular).
- **Doble cortina (DCX):** Es un marcador específico de neuronas jóvenes. La doble cortina se expresa en neuronas desde, aproximadamente, los 4 días de la mitosis cuando aún es una neurona inmadura (aunque ya diferenciada hacia la estirpe neuronal), hasta el establecimiento de la sinapsis con otras neuronas una vez integrada en la zona granular. En ocasiones está asociado a la emigración neuronal.

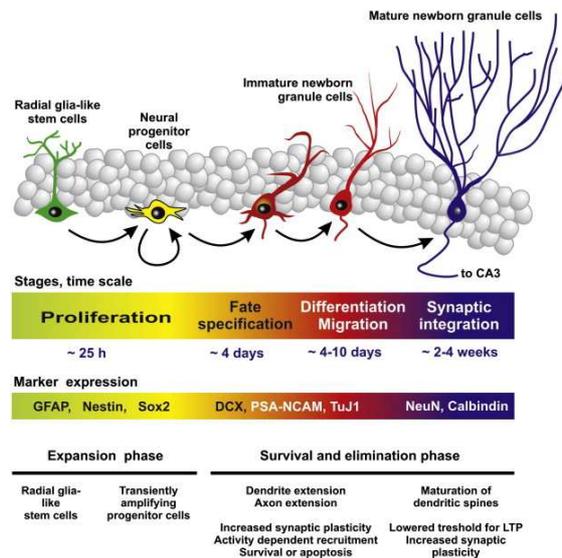


Fig.11 Estadios de maduración de una neurona en el giro dentado del hipocampo. Se observa la emisión de dendritas hacia la zona CA3 del cuerno de Ammón. En la figura se asocian las fases de proliferación, diferenciación, migración e integración sináptica con los marcadores antigénicos que expresa la nueva neurona.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

El hallazgo del siglo XX de la neurogénesis en el cerebro adulto acaba con uno de los dogmas de la historia de la medicina. La existencia de dos nichos neurogénicos en la edad adulta abre múltiples expectativas terapéuticas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer o el Parkinson así como la comprensión más exhaustiva de la fisiología cerebral. También abre un amplio campo de estudio en cuanto a células madre neurogénicas se refiere.

En este trabajo se intentará demostrar que el fluido cerebroespinal embrionario (CSF-E) es un potente activador mitogénico y neurogénico de progenitores neurales del cerebro adulto del ratón. Se intentará cuantificar cuánto influye el CSF-E respecto a muestras control y si los cambios observados son estadísticamente significativos. Se ha cuantificado:

- El efecto en base al estudio del comportamiento celular mediante la evaluación del grado de replicación.
- El efecto en base al estudio del comportamiento celular mediante la evaluación del grado de diferenciación.
- El efecto en base al estudio del comportamiento celular mediante la evaluación de la emigración de neuronas jóvenes.

Esto abre una vía de estudio, además, acerca de la composición del CSF-E y sus posibles implicaciones terapéuticas en neuroregeneración.

MATERIALES Y MÉTODOS

INTRODUCCIÓN

Se probará la influencia del CSF-E en cuanto a la proliferación y diferenciación de las células precursoras neuronales mediante un cultivo organotípico de cerebro de ratón adulto de aproximadamente una semana de duración.

Se trata de un cultivo a medio plazo, por lo que es necesario realizarlo en condiciones totalmente asépticas. Para ello, la manipulación de tejido cerebral se ha realizado en campanas de flujo laminar con reactivos y materiales estériles. La superficie de trabajo se ha radiado con luz ultravioleta y, posteriormente, limpiado con alcohol. Tanto el material de microcirugía como las soluciones se autoclavan (ágar, Ringer, puntas de pipeta). Si ello no fuera posible, el instrumental se esterilizó en seco en campana germicida (cuchillas, mallas, papel de filtro, placas, arandelas...) El material estéril se conserva en bolsas de celofán selladas. La esterilización se realizó el día antes del cultivo.



A

B

Fig 12. A. Campana de flujo laminar. Todos los procedimientos se han realizado en una campana similar a la de la figura para garantizar las condiciones de esterilidad necesarias para el cultivo. B. Autoclave. Todo el material de microcirugía se ha autoclavado y almacenado en bolsas estériles.

MATERIALES

Bacto-agar: Preparar bacto-agar en agua destilada (pH=7.3-7.4) al 3% (3g/100ml agua destilada) en botella pequeña de 250 ml (que quepa en el microondas). Autoclavado sin cerrar del todo el tapón. Dejar a temperatura ambiente y licuar en microondas de baja potencia (P30 del microondas del laboratorio) el día que se vaya a hacer el cultivo y dejarlas en un baño a 55°C.

Ringer: Autoclavado y conservar a 4°C en el frigorífico.

Glucosa: Preparar glucosa al 25% en agua destilada. Se prepara previamente en solución Stock (glucosa al 25%). 20ml de agua destilada + 5g de glucosa. Se disuelve con calor y posteriormente se filtra en campana. Filtrar en campana y guardar a 4°C.

HBSS+6.5mg/ml de glucosa a 4°C: Se preparan 100ml de HBSS y se añaden 2.6ml de glucosa al 25%.

Medio de cultivo DMEM: 50ml. Se debe tapar el tubo con papel de aluminio para evitar la luz.

- 50% Advanced DMEM: 25ml
- 25% Horse serum: 12.5ml
- 25% HBSS: 12.5ml
- 1% Antibiótico P+S: 0.5ml
- 6.5mg/ml glucosa (37°C): 1ml

Colágeno tipo I de cola de rata: Se resuspende a 1mg/ml en 0.1N de ácido acético y se guarda a 4°C. Posteriormente se prepara colágeno/DMEM/FBS (suero bovino fetal) en proporción 8:1:1 en un eppendorf de 1ml.

- 800µl de colágeno.
- 100 µl de FBS.
- 100 µl de DMEM

Guardar a 4°C hasta utilizar. Después se mantiene a temperatura ambiente durante el experimento.

OBTENCIÓN DE CSF-E DE EMBRIONES DE RATÓN

Se anestesiaron hembras preñadas de ratón y, mediante laparotomía abdominal, se extrajeron los embriones, de 11.5 días, del útero materno cultivándoles en una placa petri tras quitar las membranas vitelina y amniótica (Fig13.A). Mediante lupa y con ayuda de un micromanipulador, se aspiró el CSF-E de la cavidad rombencefálica de los embriones con ayuda de una micropipeta de vidrio de 30-40 µm de diámetro interno (Fig 13.B). Como la cantidad de CSF-E extraída de un solo embrión es muy poca, se elabora un pool utilizando varios embriones. CSF-E es almacenado en un eppendorf, liofilizado y conservado a -40°C hasta su uso.

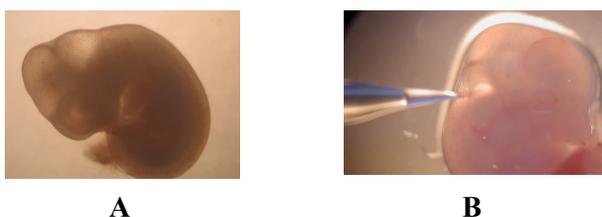


Fig 13. A. Detalle de un embrión de rata de 11.5 días. B. Microaspiración de CSF-E de la cavidad rombencefálica de un embrión de rata.

ESTABULACIÓN Y ANESTESIA DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

Se han empleado ratones adultos de la raza Swiss-webster, (Fig 14.A) estabulados en condiciones óptimas y estables de temperatura y humedad y con ciclos alternantes de luz y oscuridad para así regular su biorritmo y eliminar posibles factores estresantes (Fig 15.B). Los animales muestra han sido tanto machos como hembras de aproximadamente 8 semanas de edad.

Tanto el manejo como la anestesia de los animales han sido realizados por personal cualificado y siguiendo la normativa vigente respecto a animales de experimentación (RD 1201/2005 de 10 de octubre, Ley 32/2007 de 7 de noviembre). La anestesia de los ratones se realizó por inyección intraperitoneal de una mezcla de 0.2ml de Ketamina (150 mgr/Kg de peso) y 0.08ml de Xylacina (10 mgr/Kgr de peso) que en conjunto proporcionan una anestesia profunda y duradera. Esto se comprobó echando varias gotas de etanol sobre la córnea del ratón anestesiado. Antes de realizar la extracción de los cerebros, todos los ratones fueron sacrificados por decapitación.

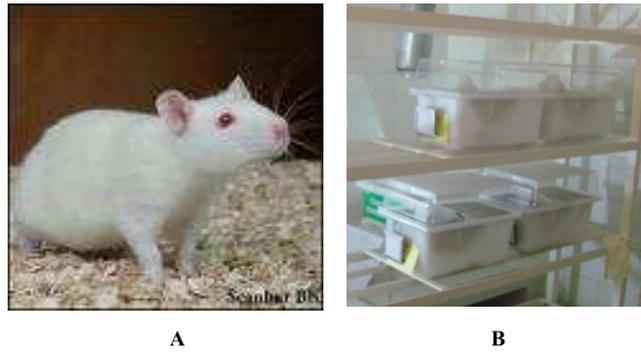


Fig 14. A. Ratón Swiss-webster de dos meses de edad, modelo de cerebro para el estudio. B. Condiciones de estabulación de los ratones.

En el primer cultivo se han utilizado tres ratones y en los siguientes se utilizaron dos.

OBTENCIÓN DEL TEJIDO CEREBRAL

En primer lugar se esterilizó la zona para la extracción del cerebro del ratón adulto. La extracción se realizó previamente a la decapitación del animal. Se coloca al ratón en posición decúbite y tras estirar la piel del animal, se desinfectó la cabeza con alcohol y se procedió a retirar el pelo y la piel del animal mediante una incisión en la línea media con tijeras curvas. Una vez hecho esto, el animal se sacrificó mediante decapitación con unas tijeras.

Se realizó una incisión en la línea media de la bóveda craneal. Tras apartar la piel y estirarla, para una mejor visibilidad de la zona, se procedió a cortar el cráneo del animal por la línea media teniendo cuidado de no rozar en ningún momento en encéfalo del ratón. Ayudándose con pinzas de relojero para apartar la bóveda craneal del encéfalo del ratón, se realiza palanca desde abajo con una espátula y, descartando el bulbo olfatorio, los nervios craneales y el cerebelo, se levanta con cuidado el encéfalo depositándolo en un frasco estéril con medio salino Ringer frío.

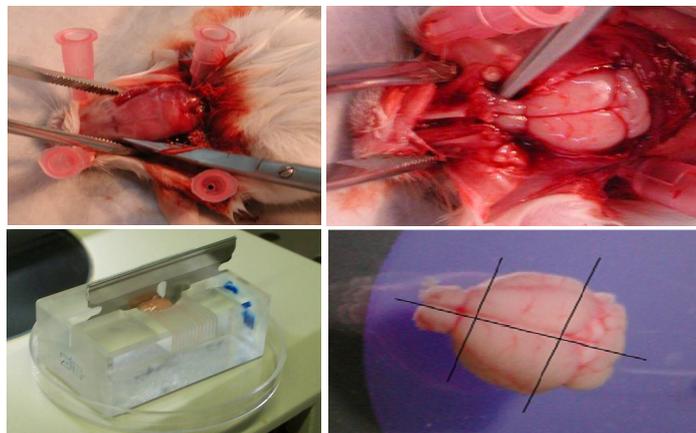


Fig 15. Procedimiento de extracción del cerebro de ratón. Apertura del cráneo del ratón (arriba a la izquierda). Extracción del encéfalo del ratón separándolo de los nervios (arriba a la derecha). Cortacerebros (abajo a la izquierda) El cerebro se coloca en la apertura central del cortacerebros y se corta con una cuchilla tanto el cerebelo como el bulbo olfatorio (abajo a la derecha). También se separan los dos hemisferios cerebrales.

CULTIVO

Se introduce el cerebro en el cortacerebros para sujetarlo correctamente mientras se pasa una cuchilla por la sección sagital media para separar el cerebro en los dos hemisferios. Después se recortan los extremos de los polos frontal y occipital de ambos (Fig 15). Cada hemisferio es depositado en un molde. Cada molde, depositado en una placa de petri, es rellenado con agar estéril al 3%, mantenido en estado líquido a 56°C, hasta más de la mitad del molde. Cuando empieza a solidificar, se coloca un hemisferio verticalmente en el molde y se orienta (Fig 16.A).

Una vez solidificado cada bloque (Fig 16.B), se recorta un cuadrado con una cuchilla y se pega en el vibratomo Leika VT 1200 con agar con el que se obtienen secciones seriadas de la zona del hipocampo junto con la zona ventricular adyacente al mismo (Fig 16.C). Se cortan secciones seriadas de 300 μm que se recogen del vibratomo con un cubreobjetos estéril mojado con solución DMEM (Fig 16.D).

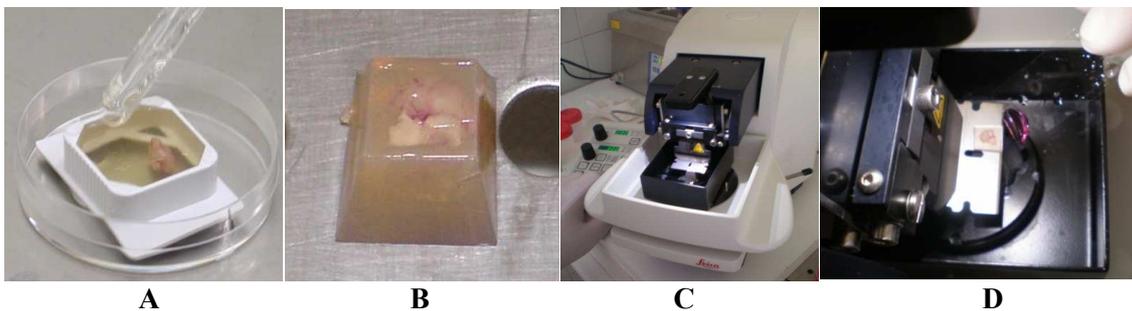


Fig 16. A. Molde con agar líquido en el cual se deposita cada hemicerebro orientado convenientemente. B. Molde de agar con el hemicerebro una vez solidificado. C. Vibratomo Leika VT. El molde se coloca en el vibratomo y se corta en secciones de 300 μm que se recogen con un portaobjetos húmedo D.

Cada sección se pasa a una placa petri con HBSS + 6.5mg/ml de glucosa frío (Fig 17)



Fig 17. Placa de petri con medio donde se colocan las secciones una vez cortadas con el vibratomo.

Bajo lupa se seleccionan las secciones más idóneas para ser cultivadas y se elimina la parafina mediante pinzas..

Las secciones óptimas para el cultivo son colocadas sobre un rectángulo papel de filtro Millipore de 0.8 μm de tamaño de poro, previamente hervido en agua destilada durante 3 minutos en microondas para eliminar sustancias que pudieran afectar al tejido. Cada sección se cubre con una gota (aproximadamente 5 μl) de colágeno preparado el mismo día del cultivo. El colágeno favorece la nutrición e hidratación del tejido, ya que los nutrientes los absorbe por capilaridad.

En el caso de las secciones experimentales, se implantan bolitas o beads de látex impregnadas en CSF-E preparadas con 24h de antelación y en el caso de los controles las bolitas de látex están impregnadas en Ringer. Se implantan antes de cubrir el corte con colágeno. Esto permite una acción localizada y de liberación lenta de E-CSF en la zona de implantación en el tejido cerebral experimental.

Por último, el papel de filtro con la sección se introduce en un pocillo de una placa del cultivo (Nunc) tratada con D-polilisina (Fig 18.A), que contiene un anillo de teflón que sujeta a una malla metálica sobre la cual se depositará el papel de filtro con la sección. Este montaje es necesario para que el papel de filtro con la sección no se hunda en el pocillo y pueda flotar, asegurando así su viabilidad y supervivencia durante el cultivo.

A cada pocillo se añaden 350 μ l de medio de cultivo DMEM. Se mantienen en un incubador de CO₂ al 5% y a 37°C durante 6-7 días (Fig 18.B). El medio se cambió 3 veces a la semana, aunque en el último cultivo se cambió todos los días de la semana. Para el cambio de medio se retira el medio antiguo con una pipeta automática P1000 y añadiendo el nuevo medio suavemente por las paredes del pocillo.



A **B**
Fig 18. A. Placa de cuatro pocillos, tratada con polilisina, donde se realizará el montaje con las secciones. B. Incubador de CO₂ donde se cultivarán las secciones durante 6-7 días.

A posteriori, unas 72h horas después del cultivo, se añade BrdU, para marcar las células en división. Se echaron 10 μ l de BrdU en cada pocillo.

FIJACIÓN EN PARAFINA

Transcurridos los 6-7 días de cultivo, los cortes se fijaron en Carnoy (60% alcohol, 30% cloroformo y 10% ácido acético). Se trasvasaron los cortes pegados al papel de filtro Millipore junto con la malla metálica encima para permitir su sujeción, a una placa petri de vidrio con Carnoy y se mantienen en ella durante 5 minutos, tiempo en el cual se aprecia que el papel de filtro azul empieza a desteñir. Después se cambia el Carnoy y en él se deja 1 hora aproximadamente en agitación suave.

Después se deshidrataron los cortes sometiéndolos a diversos pases con alcoholes con agitación en balancín para evitar que el tejido se pegase a la superficie de la placa petri.

- Etanol 96% durante 30 minutos.
- Etanol 100% : dos pases de 30 minutos cada uno.
- Xilol: un pase durante 15 minutos.
- Xilol: un pase durante 10 minutos.

Tras la deshidratación se procedió a su inclusión en parafina durante dos horas en estufa a 60°C. Después se realizaron los bloques de parafina para su posterior corte en secciones seriadas de 10 μ m para la realización de la inmunocitoquímica.

INMUNOCITOQUÍMICA

La valoración de los resultados se ha hecho en base al estudio inmunocitoquímico del grado de maduración de las células madre de la zona subventricular del cerebro de ratón adulto. Como estrategia general hemos utilizado el comarcaje de las células con BrdU que identifica a los precursores altamente proliferativos por ser las únicas que tienen capacidad de replicación (a excepción de los precursores neuronales indiferenciados que mantienen una capacidad de replicación atenuada) en el cerebro adulto. Además este marcaje permite identificar a su

progenie (ya que continúa marcando el núcleo tras dividirse y diferenciarse), mediante el uso de otros marcadores que permiten valorar el grado de maduración de estas células (precursor neural, neuroblasto joven, neuroblasto migratorio, neurona joven etc.). A continuación describimos brevemente tres protocolos seguidos con distintos anticuerpos.

Dadas las características de los anticuerpos empleados y del inmunomarcaje sobre tejido cultivado, hemos seguido en todos los casos un protocolo estándar que se resume a continuación:

Para el experimento con anti-BrdU y Anti-Tuj1.

- 2 pases con xilol de 7 minutos cada pase para la desparafinación.
- 2 pases con alcohol 100% de 7 minutos cada pase para la rehidratación del tejido.
- Agua corriente durante 15 minutos.
- CIH 1M a 37°C. 1 hora (estufa) para desnaturalizar el DNA.
- Ácido bórico 0.1M pH=8.6 durante 10 minutos para estabilizar el pH básico.
- Reposar hasta llegar a temperatura ambiente.
- Tres lavados con TRIS durante 5 minutos cada uno.
- 150 µl anticuerpos primarios toda la noche a 4°C y cámara húmeda.
- 3 lavados de 5 minutos cada uno en TRIS pH=7.3 para equilibrar el pH celular.
- 150 µl anticuerpos secundarios durante 1 hora en cámara húmeda y oscuridad.
- 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- Lavado con agua destilada.
- Montaje con medio acuoso. Secado. Mirar en el microscopio confocal (Fig 19).

Para el experimento con anti-BrdU y Anti DCX

- 2 pases con xilol de 7 minutos cada pase para la desparafinación.
- 2 pases con alcohol 100% de 7 minutos cada pase para la rehidratación del tejido.
- Agua corriente durante 15 minutos.
- CIH 1M a 37°C. 1 hora (estufa) para desnaturalizar el DNA.
- Ácido bórico 0.1M pH=8.6 durante 10 minutos para estabilizar el pH básico.
- Reposar hasta llegar a temperatura ambiente.
- Tres lavados con TRIS durante 5 minutos cada uno.
- 150 µl anticuerpos primarios toda la noche a 4°C y cámara húmeda.
- 3 lavados de 5 minutos cada uno en TRIS pH=7.3 para equilibrar el pH celular.
- 150 µl anticuerpos secundarios durante 1 hora en cámara húmeda y oscuridad.
- 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- Lavado con agua destilada.
- Montaje con medio acuoso. Secado. Mirar en el microscopio confocal (Fig 19).

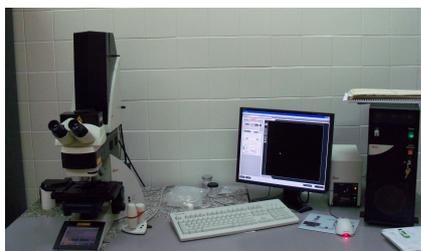


Fig 19. Microscopio confocal con el que se han tomado las imágenes de la inmunocitoquímica.

Los anticuerpos que se han usado en la inmunocitoquímica han sido:

- **Anti BrdU:** Hecho en ratón (Dako. Ref.: M7240), dilución 1/100. **Secundario:** Antimouse Ig G-Alexa 488 (Invitrogen. Ref.: 10680), Dilución 1/1000. Ocasionalmente se usó Alexa 594 (Invitrogen. Ref.: A11005) Dilución 1/1000.
- **Anti-Tuj1.** Hecho en conejo (SIGMA. Ref.: T2200), dilución 1/20. **Secundario:** Antirabbit IgG-Alexa 488 (Invitrogen. Ref.: A11008), dilución 1/1000.
- **Anti DCX (Doblecortina):** Hecho en conejo (Abcam. Ref.: ab18723), Dilución 1/1000 → Secundario Antirabbit Ig G-Alexa 594 (Invitrogen. Ref.: A11008), dilución 1/1000.

En el primer experimento se han marcado las células con anti- BrdU (rojo) y anti- Tuj1(verde). Se han sacado diversas fotos de varias muestras de tejido de un mismo cultivo y se han elegido 7 controles y 11 experimentales (Fig 20). Se han contabilizado tan sólo las células que expresaban un co-marcaje de ambos marcadores en el hilus del hipocampo. Las células que expresan marcador anti-BrdU son las neuronas en proliferación mientras que las que expresan anti- Tuj1son las neuronas recién nacidas, diferenciadas ya a linaje neuronal.

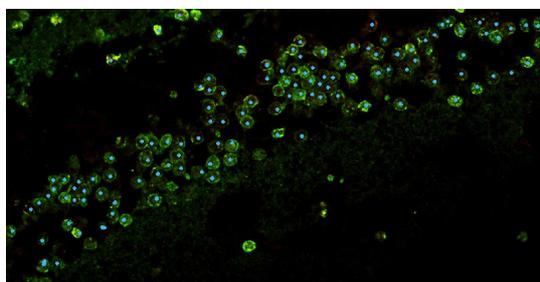


Fig 20. Método de conteo utilizado para realizar la comparativa entre controles y experimentales.

En el segundo experimento se han contabilizado por separado las células que expresan anti BrdU, las células que expresan anti-DCX y co-marcaje. En este segundo experimento se han contabilizado todas las células.

En ambos experimentos se han comparado los resultados de los controles con los experimentales. En todos los casos se comprobó que la diferencia fuera estadísticamente significativa.

Sobre las imágenes obtenidas con el microscopio laser confocal, se realizó una magnificación para obtener campos de $0,0269 \text{ mm}^2$, sobre los que se contaron las células marcadas con un anticuerpo o las que presentaban doble marcaje. En todas las condiciones experimentales y en cada anticuerpo o comarcaje se emplearon 15 campos de cultivos diferentes para la obtención de datos. Para el análisis de los datos hemos empleado la media \pm la desviación estándar y la significatividad estadística se midió mediante una T de Student de doble cola.

RESULTADOS

Experimento con anti-BrdU y Anti-Tuj1.

En este experimento se ha se ha cuantificado la influencia de CSF-E en la proliferación y diferenciación de nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo.

Para ello se han tomado diversas imágenes con el microscopio confocal de la zona a estudiar, es decir, del hilus del hipocampo, justo antes de que las neuronas, que proceden del ventrículo lateral, entren en contacto con la zona subgranular del giro dentado del hipocampo.

El anticuerpo anti-BrdU, en este caso tiene una longitud de onda $\lambda = 594$ nm, luego entra dentro del campo de color rojo. BrdU, al intercalarse en el DNA del núcleo celular hace que los núcleos se tiñan de rojo. Las células cuyo núcleo estaba teñido de rojo en las imágenes, están en un proceso proliferativo.

El anticuerpo anti-Tuj1 tiene una longitud de onda $\lambda = 488$ nm, que entra dentro del campo de color verde. La proteína Tuj1 es citoplasmática, luego el citoplasma de las células que se diferenciaron a neuronas jóvenes mostraban su citoplasma teñido de verde.

Tuj1 es el marcador más ampliamente aceptado para valorar la diferenciación neuronal temprana, acontecida antes de que la neurona se diferencia morfológicamente.

En este experimento se han contado únicamente las células que expresaban co-marcaje de ambos anticuerpos y que presentaban un aspecto redondeado, descartando las células que podían presentar en sus inmediaciones cuerpos apoptóticos así como las células que estaban insertadas ya en el tejido. Las células que se han contabilizado tienen un aspecto como el siguiente (Fig 21):

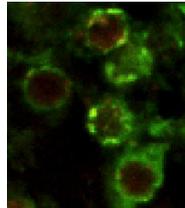


Fig 21. Células que expresan comarcaje de los anticuerpos anti-BrdU y anti-Tuj1. Nótese la tinción roja en el núcleo y la tinción verde en el citoplasma.

Se han contabilizado 7 imágenes de los cerebros controles y 11 imágenes de los cerebros experimentales de 3 experimentos distintos. Las imágenes seleccionadas son las de mejor resolución, nitidez y vistas más representativas del área que se quiere estudiar (Fig 22).

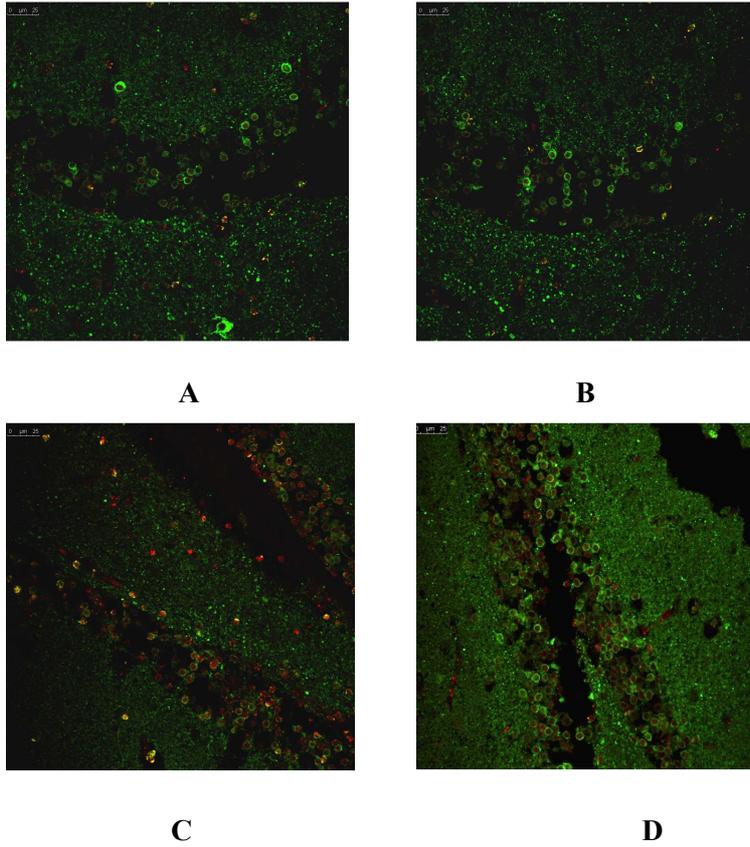


Fig 22. A,B. Fotografías controles del hilus del hipocampo. C,D. Imágenes experimentales de hilus del hipocampo. Obsérvese el aumento de la proliferación en las imágenes C y D respecto a los controles.

A simple vista puede observarse que, si se contraponen las fotografías del hilus control con las fotografías del hilus tratado con CSF-E, el aumento de células en el mismo es significativo (Fig 22, C y D). Las células que, conforme se van diferenciando, formarán las nuevas neuronas jóvenes, y por tanto expresan β -Tuj1, antes de llegar a su destino final, forman clústers o agregados celulares que van avanzando desde el ventrículo lateral por el hilus hasta la zona subgranular a partir de la cual migrarán hacia capas más superficiales del hipocampo ubicándose en su lugar definitivo.

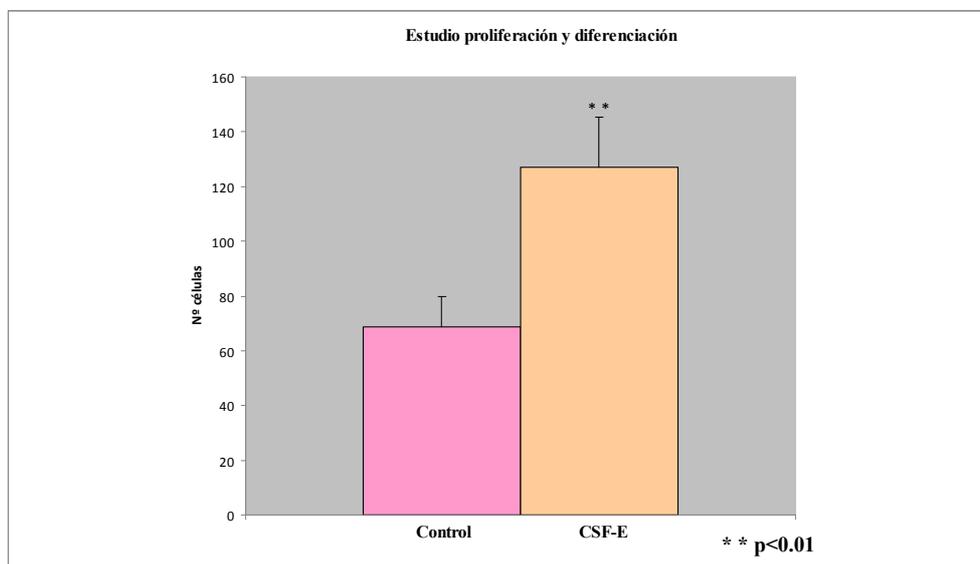
En primer lugar se han contabilizado todas las células positivas para Tuj1, anteriormente descritas en el hilus del hipocampo. Para comparar unas imágenes con otras se han realizado en imágenes con la misma escala. Se ha realizado una gráfica con los resultados obtenidos:

ZSG	N° células
Control	68.71429 \pm 11.02594
CSF-E	132.1818 \pm 28.53706

Se ha evaluado gráficamente la comparativa entre los datos controles y los datos experimentales. Para estimar si la diferencia entre ambos es significativa o no, se ha realizado una t de Student de doble cola y con varianzas distintas puesto que controles y experimentales no proceden, o no tienen por qué proceder, de la misma muestra.

Se valora el comarcaje. Las células BrdU positivas marcan las células madre y las células Tuj1 positivas son neuronas jóvenes. Se está valorando la neurogénesis a partir de células madre.

Calculando el p valor ha dado un resultado de $p = 1.13 \cdot 10^{-5} < 0.01$, luego la diferencia entre controles y E-CSF es estadísticamente significativa.



Todos estos resultados inducen a pensar que CSF-E aumenta la neurogénesis al haber mayor proliferación de precursores autoregenerando y expandiendo el nicho de células madre del que provienen. También ejerce una intensa influencia en la diferenciación de estas células, induciendo su diferenciación a neuronas.

La cantidad de Tuj1 influye directamente en la diferenciación neuronal. Por esto, se ha hecho una subdivisión en la categoría de las células positivas para los anticuerpos anti-BrdU y para anti-Tuj1. Se han dividido en 2 grupos según la intensidad del marcaje para Tuj1 que se observa:

- **Marcaje leve:** La cantidad de Tuj1 que rodea al citoplasma de la célula es discreta y no aparece constante en todo el citoplasma.
- **Marcaje intenso:** La cantidad de Tuj1 bordea al citoplasma y tiene una expresión constante en toda el área.

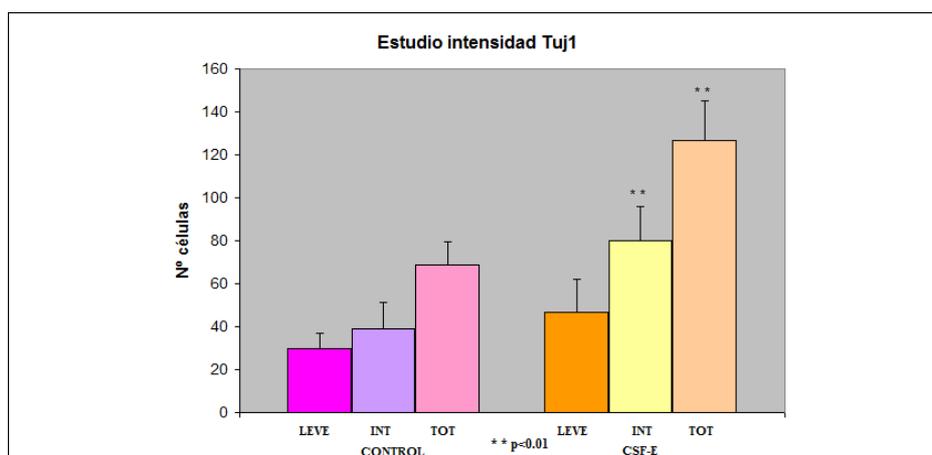
Conforme a los resultados obtenidos, se ha realizado una tabla con los mismos:

Marcaje	Control	CSF-E
Leve	29.57143± 7.457818	46.81818± 15.00545
Intenso	39.14286± 12.01982	80.09091± 15.77628

Se observa que, al hacer la división entre marcaje leve e intenso, tanto en controles como en experimentales predomina el marcaje de Tuj1 intenso

La diferencia entre células que expresan co-marcaje BrdU-Tuj1 con expresión de Tuj1 leve, entre controles y experimentales no es estadísticamente significativa mientras que sí lo es para

las células que expresan co-marcaje con una expresión de Tuj1 intensa como indica el gráfico adjunto:



El incremento de células co-marcajeadas con un marcaje de Tuj1 intenso, se multiplica por dos (aproximadamente un 50%) en experimentales respecto a controles. Estos resultados indican que CSF-E induce la diferenciación a neuronas de las células precursoras neurales aparte de ejercer una influencia directa en su proliferación como ya se ha demostrado con el experimento anterior.

Experimento con anti-BrdU y Anti DCX.

En este experimento se han cuantificado por separado las células en proceso de replicación y las células que se están diferenciando a neuronas. Como marcador de éstas últimas se ha utilizado doblecortina (DCX).

Se ha valorado de forma similar al experimento anterior. Las células BrdU positivas provienen de células madre mitóticas y las células positivas para DCX provienen de células madre o neuronas con capacidad de emigración.

Para ello se han tomado diversas imágenes con el microscopio confocal de la zona a estudiar, es decir, del hilus del hipocampo, justo antes de que las neuronas, que proceden del ventrículo lateral, entren en contacto con la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. En este caso se han contabilizado todas las células

El anticuerpo anti-BrdU, en este caso tiene una longitud de onda $\lambda = 488$ nm, luego entra dentro del campo de color verde. Se pueden observar a las células positivas para BrdU como tienen una coloración verde intenso.

El anticuerpo anti- DCX tiene una longitud de onda $\lambda = 594$ nm, que entra dentro del campo de color rojo. Las células que presentan este marcador se observan teñidas de rojo intenso.

En este experimento se ha tomado para una misma imagen dos campos distintos, uno para detectar las células positivas para BrdU (Fig 23) y otra para detectar las células positivas en DCX (Fig 24).

Se han contabilizado 12 imágenes de los cerebros controles y 12 imágenes de los cerebros experimentales de 3 experimentos distintos y todas ellas con la misma escala. Las imágenes seleccionadas son las de mejor resolución, nitidez y vistas más representativas del área que se quiere estudiar.

Estudio de proliferación: BrdU.

BrdU se intercala en el ADN celular e identifica a los precursores neurales, las únicas células con capacidad replicativa en el cerebro adulto. Los descendientes de estas células madre “heredan” este marcaje nuclear y lo expresan, por tanto es fácil identificar a las futuras neuronas que provienen de las células madre anteriormente mencionadas.

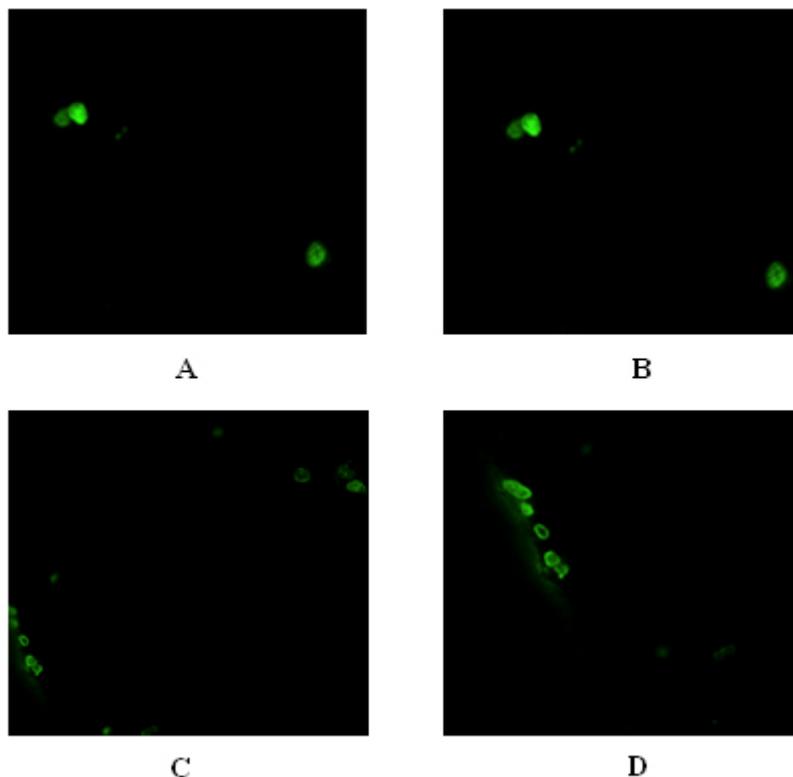
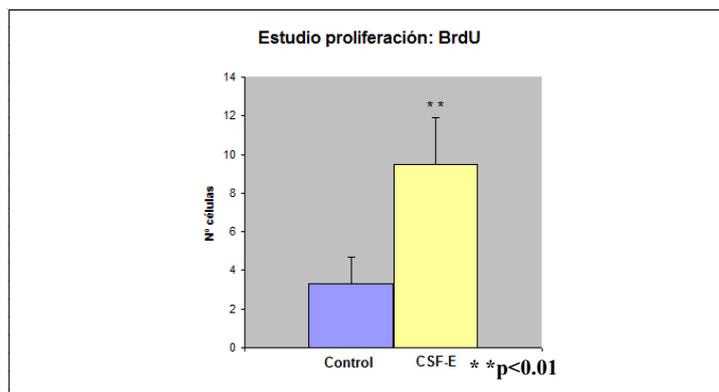


Fig 23. A,B Fotografías control de células marcadas con el anticuerpo anti-BrdU. C,D Imágenes experimentales de células positivas para el anticuerpo anti-BrdU. Nótese el aumento de células marcadas en las fotografías del tejido tratado con CSF-E.

Observando las imágenes se puede ver un aumento moderado de la proliferación en la zona subgranular de las muestras experimentales respecto a los controles. Tan sólo se observan unas pocas células. Esto es porque la escala de las imágenes es pequeña y porque en el cerebro adulto la proliferación, así como la diferenciación, se produce a menor escala.

ZSG	N° células
Control	3.33333333 ± 1.3662601
CSF-E	9.5 ± 2.42899156

Sin embargo, tratando las muestras con CSF-E, la proliferación aumenta un **185.056%** respecto a las muestras control, siendo este dato estadísticamente significativo con un **p valor = 0.00066498 < 0.01**. Elaborando una gráfica se observa mejor el aumento.



Estos resultados indican que CSF-E aumenta la proliferación y, por tanto, expansión del nicho de células madre. Esto permite la autoregeneración del mismo.

Estudio de diferenciación: DCX.

DCX es un marcador citoplasmático asociado a los microtúbulos de las neuronas jóvenes con capacidad migratoria.

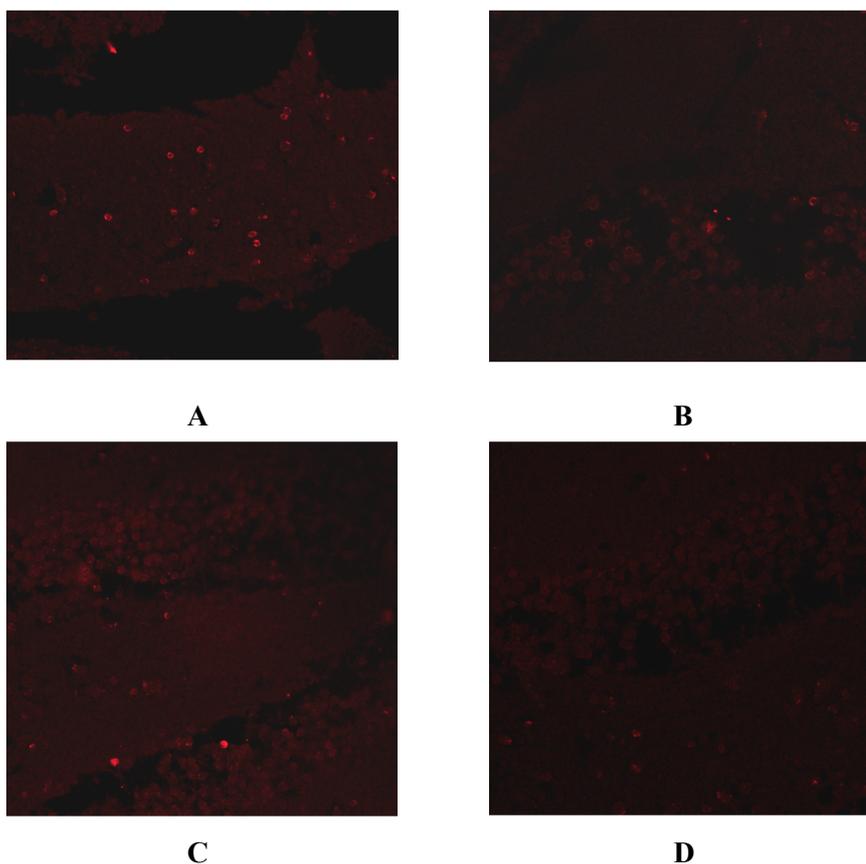
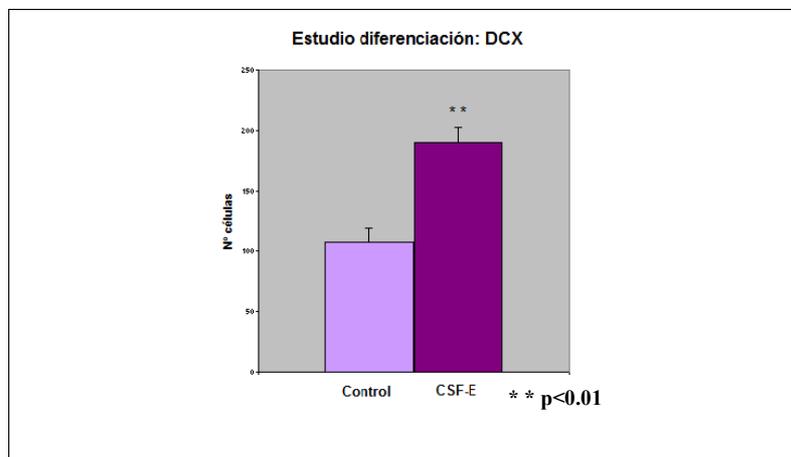


Fig 24. Fig 23. A,B Fotografías control de células marcadas con el anticuerpo anti-DCX. C,D Imágenes experimentales de células positivas para el anticuerpo anti-DCX. Se observa el aumento de células marcadas en las fotografías del tejido tratado con CSF-E.

Al igual que en el experimento anterior, observando las dos imágenes se aprecia un aumento considerable de las células positivas para DCX en las muestras experimentales respecto a las muestras control. Este hecho confirma una vez más el efecto de CSF-E en la diferenciación celular en la zona subgranular del hipocampo.

ZSG	N° células
Control	107.6666667± 11.34313302
CSF-E	190 ± 12.4579292

Cuantificando las células aptas para ello, se ha contabilizado un aumento de **76.415%** en las muestras experimentales respecto a los controles. Calculando el estadístico p valor se ha calculado que es $p = 3.24578 \cdot 10^{-7} < 0.01$.



Según el análisis de los resultados obtenidos, CSF-E aumenta e induce la emigración de las neuronas jóvenes hacia el lugar donde, posteriormente, se ubicará permanentemente y se integrará formando sinapsis con otras neuronas.

Estos resultados demuestran que CSF-E induce a las células que provienen de células madre a diferenciarse a linaje neuronal así como incentivar su capacidad migratoria hacia las zonas cerebrales donde las neuronas jóvenes tendrán su ubicación definitiva.

DISCUSIÓN

Valorando objetivamente los resultados obtenidos, se hará, en esta parte, un análisis de los mismos teniendo en cuenta los objetivos del proyecto.

En el cerebro adulto hay menor proliferación y diferenciación celular de precursores neurales que en el cerebro embrionario. Tipificados sólo se encuentran dos nichos neurogénicos en el cerebro adulto, uno de los cuales es la zona subgranular del hipocampo. Esta zona está en las inmediaciones del ventrículo lateral, en contacto con CSF-E, que es el causante de la proliferación y crecimiento de las vesículas cerebrales durante la formación del sistema nervioso central embrionario. Con estos datos se puede extrapolar que CSF-E puede tener implicaciones en el desarrollo de neuronas en el cerebro adulto así como inducir la migración de las mismas hacia los nichos neurogénicos anteriormente mencionados. (Arnold Kriegstein and Arturo Alvarez-Buylla. 2009)

Todos los resultados obtenidos, en general, apuntan a que el CSF-E es un agente mitogénico y neurogénico potente, ya que se observa un incremento considerable en la proliferación y diferenciación de los precursores del nicho neurogénico respecto a los controles en las muestras tratadas con el mismo. Esto puede radicar en su composición, que cambia considerablemente en embriones respecto a adultos. Los factores que ejercen dicha influencia siguen siendo desconocidos. CSF-E regula el comportamiento de las células madre neurales tanto “in vivo” como “in vitro”, como se ha demostrado en el trabajo. CSF-E puede crear un microambiente que facilita la supervivencia y la capacidad de auto-renovación de las células madre así como la producción de precursores activamente proliferativos que conducen a la generación de una progenie diferenciada a neuronas. (Ilias Kazanis, Justin Lathia, Moss Lara, y Charles Ffrench-Constant.)

En los resultados obtenidos se ha visto un gran incremento tanto de la proliferación como de la diferenciación, conjuntamente, al tratar a las células con CSF-E respecto de los controles (experimento anti-BrdU y Anti Tuj1). Esto apoya las hipótesis anteriores.

Respecto a la proliferación y diferenciación por separado, se ha visto que tanto en una como en otra, CSF-E contribuye a aumentar el número de precursores neurales positivos en las inmediaciones de las beads impregnadas en CSF-E, mientras que en los controles pueden verse menor número de células.

CSF-E, además, induce la emigración de las neuronas jóvenes hasta su lugar definitivo para la posterior integración sináptica.

CSF-E desencadena una cascada de señales que difunden hacia zonas adyacentes al mismo. Esto permite que las células progenitoras neurales, en contacto con la cavidad ventricular, migren hacia determinadas zonas del cerebro cercanas al mismo hasta su ubicación definitiva. En este caso, las células progenitoras neurales migrarían desde el ventrículo hasta la zona granular por el hilus del hipocampo diferenciándose durante el recorrido. E-CSF, además, se considera un agente quimiotáctico, influyendo en la migración celular (Sawamoto et al 2006) Se ha demostrado que la composición de CSF-E es compleja y dinámica y, así mismo, contiene un gran número de moléculas que pueden estar implicadas en los procesos de neurogénesis y morfogénesis del cerebro. CSF-E es necesario e imprescindible para mantener las características celulares básicas de las células progenitoras neurales (mantener la supervivencia y estimular su proliferación y diferenciación hacia células de estirpe neural así como para mantener la expresión de genes que determinan el patrón característico de desarrollo cerebral. (David Bueno i Torrens. Departamento de genética. Facultad de biología. Universidad de Barcelona)

El hecho de realizar un cultivo organotípico de cerebro y realizar secciones en el mismo, se puede aproximar a generar una lesión tisular en el mismo. Diversos estudios aseguran que ante una lesión tisular activa la neurogénesis y la emigración de nuevas células hacia la zona de la lesión (Zhang et al 2008, Yamashita et al 2006) Esto induce a pensar que en las muestras control haya mayor proliferación de células debido a la inducción de la lesión. En todos los experimentos realizados se ha visto que el efecto de CSF-E es mayor aún que la inducción de una lesión tisular.

El hecho de que haya menor cantidad de células en los controles que en los experimentales induce a pensar que CSF-E es importante para mantener las condiciones de las células de carácter neurogénico (supervivencia, proliferación y diferenciación) Este hecho se apoya en que en las muestras control puede haber un microambiente que induzca a las células que puedan dividirse y diferenciarse a sufrir apoptosis debido a que las condiciones del microentorno no sean las adecuadas.

Aumenta la emigración con CSF-E. La emigración es un proceso fisiológico desde el ventrículo hacia el hilus. Este dato confirma que CSF-E activa todo el proceso y refuerza la hipótesis de que las células madre del hipocampo adulto están en el ventrículo y emigran hacia el giro dentado.

CONCLUSIÓN

- CSF-E es un importante agente neurogénico y quimiotáctico de proliferación y diferenciación de células progenitoras neurales a neuronas jóvenes.
- Al tratar el tejido cerebral de ratón adulto con beads impregnadas en CSF-E, las células positivas tanto para la proliferación como para la diferenciación, conjuntamente, es mucho mayor que en el tejido de cerebro adulto tratado con Ringer.
- CSF-E aumenta la proliferación celular.
- CSF-E incrementa la diferenciación celular hacia células de estirpe neuronal.
- CSF-E induce la emigración de las neuronas jóvenes hacia el lugar donde tendrá lugar la integración sináptica.
- Mediante el tratamiento del tejido con CSF-E se observa una ruta de migración desde el ventrículo lateral hasta la zona subgranular del hipocampo por el hilus. Las células progenitoras neurales se diferencian durante este trayecto.
- El cultivo de secciones de cerebro de ratón adulto es equiparable a una lesión isquémica cerebral, luego en la zona de la lesión se observa la proliferación de células progenitoras neurales en división y en proceso de diferenciación hacia nuevas neuronas para suplir a las afectadas por la isquemia, si bien es cierto que el tratamiento con CSF-E aumenta más aún tanto la proliferación como la diferenciación celular así como la supervivencia de estas células.
- CSF-E crea un microentorno favorable para el desarrollo y auto-regeneración de las células progenitoras neurales.

BIBLIOGRAFÍA

KRIEGSTEIN. A, ÁLVAREZ-BUYLLA. A. (2009) “*The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells*” *Annu Rev Neurosci.* 2009 ; 32: 149–184. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135600.

ZHAO. C, TENG. E.M, SUMMERS. R.G. MING.G.L, GAGE.F.H.(2006). “*Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus.*” *J. Neurosci.*, 26:3–11.

ARIAS-CARRIÓN.O,OLIVARES-BAÑUELOS.T,DRUCKER-COLIN.R. « *Neurogénesis en el cerebro adulto* » *Revista de neurología.* 2007.

BALU. D. T, LUCKI, I. “*Adult Hippocampal Neurogenesis: Regulation, Functional Implications, And Contribution to Disease Pathology.*” *Neurosci Biobehav Rev.* 2009 March ; 33(3): 232–252. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.08.007.

MU. Y, GAGE.F.H. “*Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer’s disease*”(2011) *Mu and Gage Molecular Neurodegeneration* 2011, 6:85.

DENG. W, AIMONE. J.B, GAGE. F.H. “*New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?*” *Nat Rev Neurosci.* 2010 May ; 11(5): 339–350. doi:10.1038/nrn2822.

COVIC.M, KARACA.E, LIE.D.C. “*Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult hippocampus.*” *Heredity* (2010) 105, 122–134.

MAEKOVIAK.M, CHOCYK. A, MARKOWICZ-KULA.K, WEDZONY.K. “*Neurogénesis in the adult brain*” *Review. Pol. J. Pharmacol.*, 2004, 56, 673–687.

BUENO I TORRENS. D. “*Del fluido cerebrospinal a la regeneración neural pasando por las células madre*” *Pasaj. Cienc.* 14:47-53 (2011).

DESMOND. M. E, JACOBSON. A.G. “*Embryonic brain enlargement requires cerebrospinal fluid pressure*”

SAWAMOTO K, WICHTERLE H, GONZALEZ-PEREZ O, CHOLFIN JA, YAMADA M, SPASSKY N, MURCIA NS, GARCIA-VERDUGO JM, MARIN O, RUBENSTEIN JL, TESSIER-LAVIGNE M, OKANO H, ALVAREZ-BUYLLA A. (2006 Feb) “*New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain.*” *Science.* 3; 311(5761):629-32.