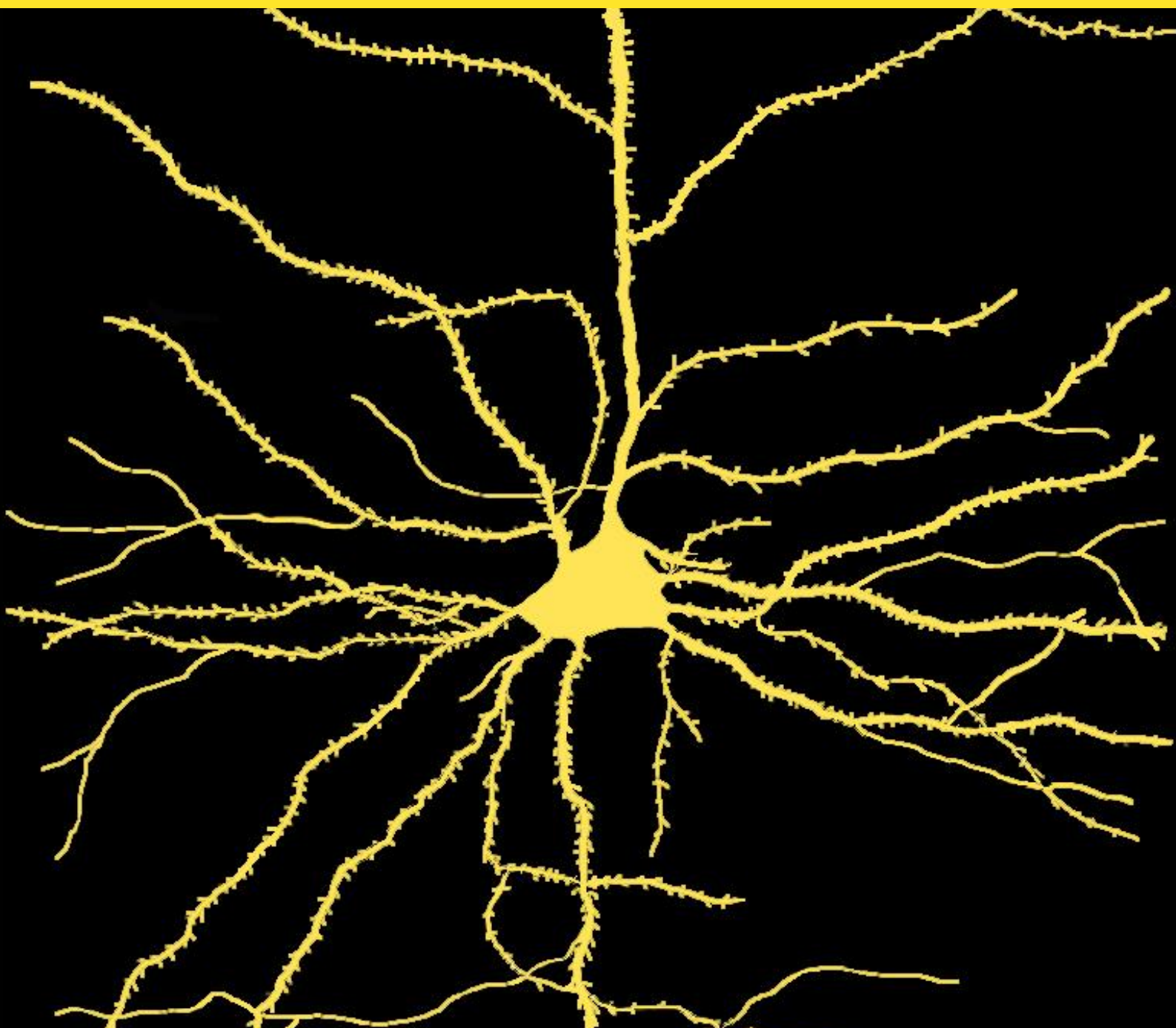


IL-1 β ESTIMULA LA NEUROGÉNESIS EN CÉLULAS AMNIÓTICAS *IN VIVO*

CURSO 2016-2017



TRABAJO DE FIN DE GRADO

IRENE CARRETERO DEL BARRIO
TUTOR: DR. ANÍBAL DE LA MANO BONÍN

ÍNDICE

Resumen	1
Abreviaturas	1
Introducción	2
<i>Desarrollo del sistema nervioso central</i>	2
<i>Fluido cerebroespinal embrionario</i>	3
<i>Interleucina-1β</i>	4
Objetivo	6
Materiales y métodos	6
<i>Obtención de embriones de pollo</i>	6
<i>Tratamiento local con interleucina-1β</i>	7
<i>Determinación de βIII-tubulina</i>	9
Resultados	9
<i>El tratamiento con interleucina-1β muestra tinción positiva frente a βIII-tubulina</i>	9
Discusión	12
Conclusión	13
Agradecimientos	14
Bibliografía	14
Póster	19

IL-1 β Estimula la Neurogénesis en Células Amnióticas *in Vivo*

RESUMEN

El fluido cerebroespinal embrionario juega un papel importante en el desarrollo y diferenciación neuronal. Este estudio investiga si la interleucina-1 β , una citoquina presente en fluido cerebroespinal embrionario, es capaz de estimular la diferenciación neuronal en un tejido no nervioso como la membrana amniótica. Se incubaron huevos fértiles de pollo para obtener embriones viables y se colocó sobre el amnios papel de filtro impregnado con interleucina-1 β o solución de Ringer. Los embriones se reincubaron durante 24 horas y se extrajo el área de la membrana amniótica en contacto con el papel. Se realizó inmunohistoquímica frente a β III-tubulina, un marcador de diferenciación neuronal temprana, y se obtuvieron imágenes usando un microscopio confocal. El tratamiento con interleucina-1 β indujo una tinción citoplásmica de β III-tubulina, apareciendo en algunos casos prolongaciones fibrilares; los controles no mostraron tinción. El patrón de tinción fibrilar de β III-tubulina en las células amnióticas puede indicar un desarrollo axonal temprano, lo que sugiere que la interleucina-1 β actúa como factor de diferenciación en el desarrollo temprano del sistema nervioso. Estudios posteriores sobre la función de otras proteínas presentes en el fluido cerebroespinal embrionario podrían contribuir a la comprensión del papel de este líquido en el desarrollo neural.

IRENE CARRETERO
ANÍBAL DE LA MANO

PALABRAS CLAVE

fluido cerebroespinal embrionario, neurogénesis, interleucina-1 β , β III-tubulina, pollo

ABREVIATURAS

E-CSF – Fluido cerebroespinal embrionario
FGF- β – Factor de crecimiento fibroblástico β
HH – Hamburger Hamilton
IL-1 β – Interleucina-1 β
IL-2 – Interleucina-2
SNC – Sistema nervioso central

INTRODUCCIÓN

DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El desarrollo temprano del sistema nervioso central (SNC) es un proceso importante y complejo. Comienza con el engrosamiento del ectodermo y la formación de la placa neural, constituyendo sus bordes los pliegues neurales. Estos pliegues crecen y acaban fusionándose en la línea media, a nivel del cerebro medio (1). En el embrión de pollo esta fusión comienza en el estadio 8 de Hamburger Hamilton (HH). Así se origina el tubo neural, el cual comunica con la cavidad amniótica mediante los neuroporos anterior y posterior. Este proceso se denomina neurulación (2) (*figura 1*).

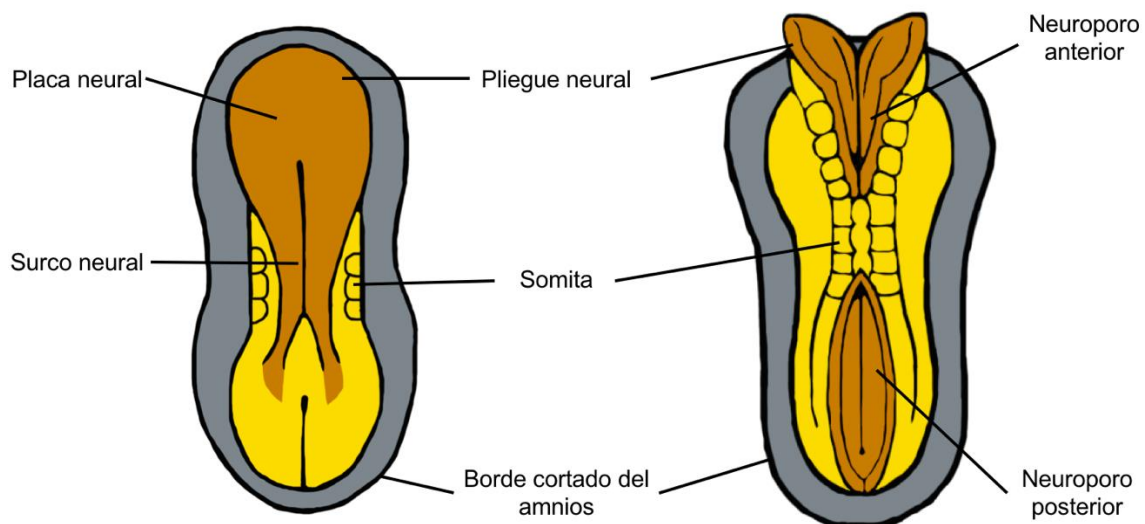


Figura 1. Representación esquemática del proceso de neurulación. Elaboración propia, a partir de (2).

Entre los estadios HH11 y HH13, cuando el tubo neural se ha fusionado por completo y los neuroporos se han cerrado, el SNC está compuesto por un tubo cerrado, con una parte caudal más estrecha, formando la médula espinal; y una parte craneal más ancha, constituida por las vesículas encefálicas. Las paredes de este tubo neural están formadas por células neuroepiteliales, que constituyen un epitelio pseudoestratificado y que posteriormente se diferenciarán a los distintos tipos de células nerviosas: neuronas y glía (3). El líquido que

contiene el tubo neural al fusionarse ya se considera fluido cerebroespinal embrionario (E-CSF, por sus siglas en inglés) (4).

FLUIDO CEREBROESPINAL EMBRIONARIO

El E-CSF tiene un papel clave en el desarrollo y la diferenciación neural (5) debido a su composición, homeostasis y la presión hidrostática que ejerce sobre las paredes del tubo neural. Esta presión hace que el volumen cerebral aumente rápidamente, expandiéndose 30 veces entre los días 3 y 5 de desarrollo en el caso del embrión de pollo (6). A este crecimiento también contribuye la proliferación celular del neuroepitelio debida a la tensión a la que la presión hidrostática lo somete. De hecho, se ha demostrado que la ausencia de la presión positiva en el interior de los ventrículos limita el crecimiento del sistema nervioso, altera su morfología y disminuye el número de células neuroepiteliales (7).

A la formación del E-CSF contribuyen los precursores neuroepiteliales que recubren el interior del tubo neural, funcionando el E-CSF y los precursores de manera interdependiente (8). En su compleja composición se incluyen proteínas, lípidos, hormonas, factores de crecimiento y factores de diferenciación. Además, se ha demostrado que el E-CSF ejerce un efecto trófico en las células neuroepiteliales, regulando la proliferación, supervivencia, expresión génica y diferenciación neuronal (5).

El E-CSF difiere del fluido cerebroespinal adulto tanto en su composición, conteniendo este último una concentración de proteínas hasta 30 veces menor (7); como en su producción, ya que el adulto se forma a partir de los plexos coroides y el E-CSF, como se ha mencionado anteriormente, a partir de los precursores neuroepiteliales. De hecho, se sugiere que el fluido cerebroespinal tiene distintas propiedades dependiendo de la edad y de su localización dentro del sistema nervioso, ya que, por ejemplo, en el adulto influye en la migración de neuronas hacia el bulbo olfatorio (9). Además, hay gran número de factores de crecimiento que aumentan su concentración tras un estímulo lesivo tanto en el cerebro como en el fluido cerebroespinal adulto, promoviendo la neuroprotección y neurogénesis. Por ejemplo, se ha demostrado en modelos de ratas con isquemia cerebral focal o tras un traumatismo craneoencefálico que la administración intraventricular de factor de crecimiento fibroblástico β (FGF- β , por sus

siglas en inglés) tiene un efecto neuroprotector y produce un aumento de la proliferación celular en regiones neurogénicas de la zona subventricular y del giro dentado (10,11).

INTERLEUCINA-1 β

La interleucina-1 β (IL-1 β) es una citocina que se encuentra en el E-CSF (3), habiéndose demostrado su presencia y la de su receptor durante el desarrollo neural (12). Fue descrita por primera vez en 1985 (13), siendo su secuencia de aminoácidos y su estructura similares en mamíferos y aves (14).

Es una citocina pro-inflamatoria, con una expresión muy limitada en condiciones normales (15), producida por macrófagos activados, monocitos, células dendríticas y neutrófilos en situaciones de inflamación. Se sintetiza como pro-IL-1 β , que debe ser sometida a una escisión realizada por la caspasa-1 (16). De este modo se forma la proteína activa de 17kDa, que es secretada a la sangre y ejerce su acción uniéndose al receptor IL-1R1 en las células diana (17), donde activa una proteína-quinasa dependiente de AMPc, una proteína de fijación de GTP y el factor de transcripción NF- κ - β (18). Así se promueve la secreción de otras sustancias proinflamatorias, como interleucina 6, óxido nítrico y prostaglandina E2 (19). Su acción biológica principal se produce en los linfocitos T-colaboradores, estimulando la secreción de interleucina-2 (IL-2) y la expresión del receptor de IL-2 en su superficie, posibilitando así su activación autocrina (20).

Al ser un importante mediador de la respuesta inflamatoria entre otras de sus funciones se encuentran la producción de vasodilatación, la atracción de granulocitos, la estimulación de la producción de prostaglandinas y la inducción de fiebre (21). Además, es capaz de estimular la diferenciación de osteoclastos a partir de precursores mononucleares, fomentando así la pérdida de tejido óseo (22); de degradar tejido cartilaginoso al promover la expresión de colagenasas (23); y de inducir la apoptosis de las células β pancreáticas, participando en el desarrollo de la diabetes (24).

En el sistema nervioso se ha descrito que la mayor producción de IL-1 β es llevada a cabo por la microglía, un tipo celular derivado del mesodermo (25) con

funciones inmunitarias y de mantenimiento (26), que además modula la vascularización, formación de sinapsis y supervivencia neuronal (27).

IL-1 β se ha visto implicada en diversas patologías neurodegenerativas, tanto agudas como crónicas. Por ejemplo, se ha demostrado que su expresión está aumentada en la enfermedad de Alzheimer (28), en la depresión (29), en infecciones, en ictus, en la enfermedad de Parkinson, en la esclerosis múltiple, en la epilepsia y en el síndrome de Down; habiéndose asociado estos niveles aumentados de IL-1 β con muerte neuronal (30). De hecho, se ha descrito que los ratones con una deficiencia de caspasa-1, la enzima que activa a IL-1 β , presentan un menor daño isquémico en comparación con los ratones salvajes tras un infarto de la arteria cerebral media (31), aunque por una vía distinta a su interacción con el receptor IL-1R1 (32). Además, en ratones adultos, se ha visto que la disminución de la neurogénesis en el hipocampo producida por el estrés es debida a la acción de IL-1 β (33). Todo esto señala hacia el papel anti-neurogénico de IL-1 β en el SNC adulto.

En el desarrollo embriológico se ha demostrado que IL-1 β promueve la proliferación y diferenciación neuroepitelial en la médula espinal de embriones de pollo, mientras que su bloqueo disminuye la proliferación (34), habiendo trabajos que asocian este mismo bloqueo a una disminución de la diferenciación neuronal (18). También hay estudios que sugieren que promueve la diferenciación e inhibe la proliferación de oligodendrocitos (35), aunque otros realizados en células humanas multipotentes de hipocampo afirman que disminuye la diferenciación neural y promueve la proliferación de células indiferenciadas (36).

Además, se ha descrito la transdiferenciación utilizando citocinas, es decir, la posibilidad de que una célula dé origen a otra de una capa embrionaria distinta de la que ella misma proviene. De hecho, esta transdiferenciación se ha realizado desde células madre mesenquimales a precursores neurales mediante su exposición a factor de crecimiento neural, factor de crecimiento epidérmico y FGF- β (37), estando algunas de estas citocinas presentes en el E-CSF (3).

OBJETIVO

Como se ha expuesto previamente, el E-CSF tiene un papel clave en el desarrollo del sistema nervioso temprano, promoviendo la diferenciación neural en cultivos de neuroepitelio (5). IL-1 β es una citocina presente en el E-CSF y se ha demostrado que tiene un papel tanto en la proliferación como en la diferenciación neuronal (18,34–36).

Así mismo, como se ha comentado, el E-CSF contiene factores capaces de inducir la transdiferenciación de células madre mesenquimales a precursores neurales (3,37).

Partiendo de estas premisas, con este trabajo se pretende averiguar si IL-1 β es capaz de promover la diferenciación neural en tejidos de naturaleza no nerviosa de embriones de pollo *in vivo*, en este caso la membrana amniótica: una monocapa celular de tejido extraembrionario derivada del epiblasto (38).

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE EMBRIONES DE POLLO

Se incubaron huevos de pollo, procedentes de la Granja Santa Isabel (Córdoba), durante 3 días a una temperatura de 37'5°C en una atmósfera con humedad relativa superior al 70%. De este modo se obtuvieron 9 embriones viables en los estadios HH16, HH17 y HH18 (*figura 2*). La elección de estos estadios es debido a la expresión de IL-1 β , la cual empieza a detectarse a partir del estadio HH14 y se intensifica en el HH17 (18). Los embriones que presentaran malformaciones o que estuvieran muertos fueron desechados.

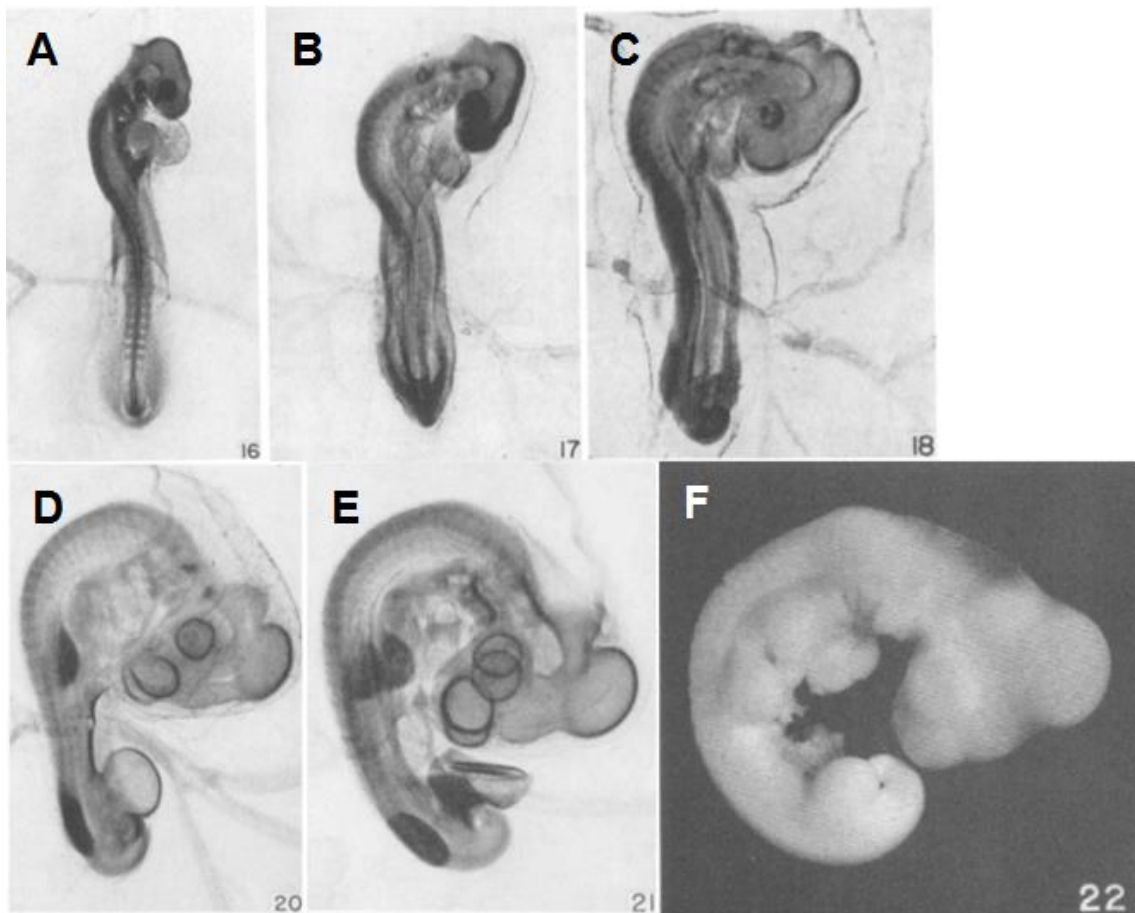


Figura 2. Estadios de los embriones utilizados. **A:** HH16, **B:** HH17, **C:** HH18, **D:** HH20, **E:** HH21 y **F:** HH22. Imágenes tal y como se muestran en el artículo original (1).

TRATAMIENTO LOCAL CON INTERLEUCINA-1 β

Se abrió una ventana amplia en la cáscara de cada uno de los huevos, exponiendo así el embrión y el área vascular y, bajo lupa, se realizó una microdissección de la membrana vitelina mediante aguja de tungsteno. De esta forma se expuso el amnios y se colocó sobre el mismo una pieza de papel de filtro previamente impregnada con una solución de 50ng/ml de IL-1 β recombinante de rata (Endogen®) en los embriones experimentales, o con solución de Ringer en los embriones control (*figura 3*). Los embriones que sufrieron hemorragias con esta manipulación fueron desechados.

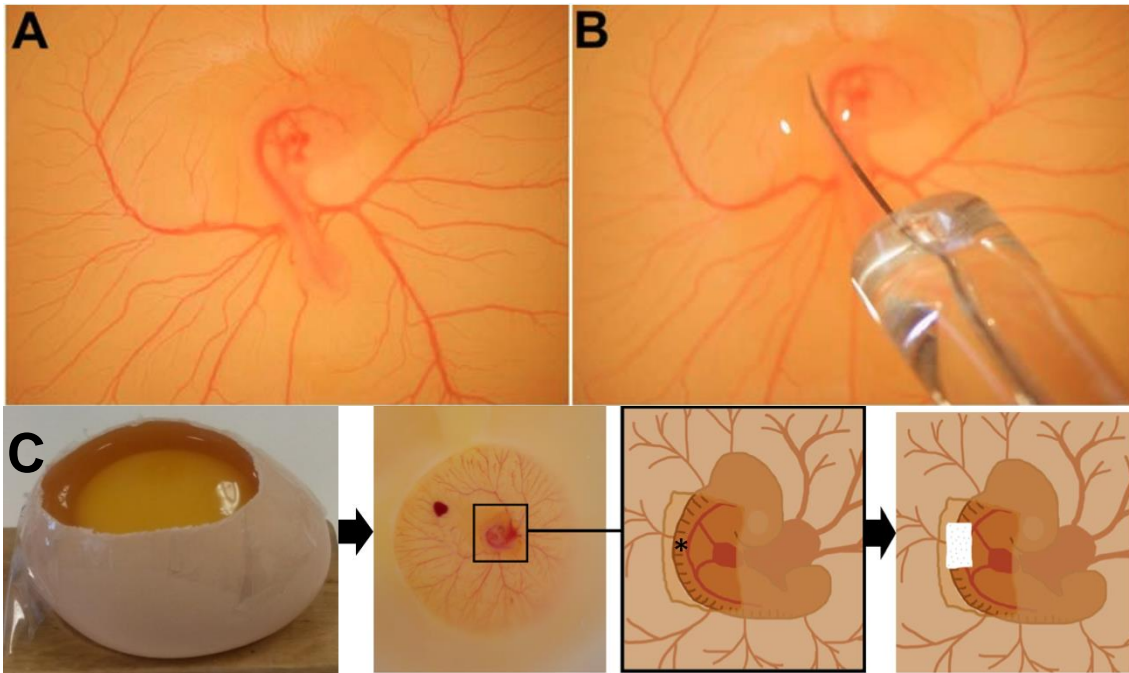


Figura 3. Manipulación de los embriones en el huevo. **A:** Imagen bajo lupa de un embrión de pollo en estadio HH18, según aparece al abrir la ventana. Imagen obtenida de (18). **B:** Microdissección de la membrana vitelina con la aguja de tungsteno. Imagen obtenida de (18). **C:** Preparación del huevo con la ventana en la cáscara, exposición del amnios y colocación del papel de filtro impregnado. El asterisco indica la posición de la membrana amniótica. Elaboración propia.

A continuación, se cerró la ventana de la cáscara con cinta adhesiva transparente y se reincubaron los embriones durante 24 horas, en atmósfera humidificada y a una temperatura de 37'5°C, hasta alcanzar los estadios HH20, HH21 o HH22 (*figura 4*).

Tras la reincubación, se volvió a abrir la ventana y se recortó bajo lupa la porción de membrana amniótica en contacto con el papel de filtro; colocándose las muestras extraídas sobre un portaobjetos para su manipulación posterior. Se desecharon aquellos embriones que estuviesen muertos o en los que el papel de filtro se hubiese desplazado de su posición sobre el amnios.

Tiempo de reincubación	Controles		Interleucina-1 β	
	Válidos	Desechados	Válidos	Desechados
24 horas	3	1	4	1

Figura 4. Embriones empleados. La primera columna muestra el tiempo de la segunda incubación a la que fueron sometidos los embriones. Las columnas restantes muestran el número total de embriones utilizados en cada condición (válidos) y los que tuvieron que ser desechados por presentar malformaciones, hemorragias o una mala implantación del papel de filtro durante la reincubación (desechados). No se incluyen los embriones muertos, malformados o fuera de estadio antes de su manipulación.

DETERMINACIÓN DE β III-TUBULINA

Se realizó inmunohistoquímica frente a β III-tubulina para detectar diferenciación neuronal temprana, utilizándose como anticuerpo primario mouse anti-human III β -tubulin (Covance®) a concentración 1:400 en PBS, incubándose durante una noche en cámara húmeda a 4°C. Posteriormente se empleó anti-mouse IgG Alexa-488 (Invitrogen®) como anticuerpo secundario, a concentración 1:3.000 en PBS e incubándose durante 1 hora en cámara húmeda oscura, a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó montaje en medio acuoso con Fluoromount (Sigma®), conservándose las muestras en cámara húmeda a 4°C. Se visualizó el resultado con un microscopio confocal Zeiss LSM-310.

RESULTADOS

EL TRATAMIENTO CON INTERLEUCINA-1 β MUESTRA TINCIÓN POSITIVA FRENTE A β III-TUBULINA

En dos de las tres muestras sometidas a reincubación durante 24 horas tratadas con IL-1 β , las células amnióticas muestran tinción citoplásmica y prolongaciones fibrilares intensamente marcadas, lo que sugiere un comienzo de desarrollo axónico y, por tanto, un principio de neurodiferenciación. En los controles

tratados con solución de Ringer, únicamente se observa señal de fondo (*figuras 5 y 6*).

Una de las muestras tratadas con IL-1 β se perdió durante la manipulación. Otra muestra, también tratada con IL-1 β , no mostró positividad frente a β III-tubulina, lo cual puede ser achacable a un error técnico.

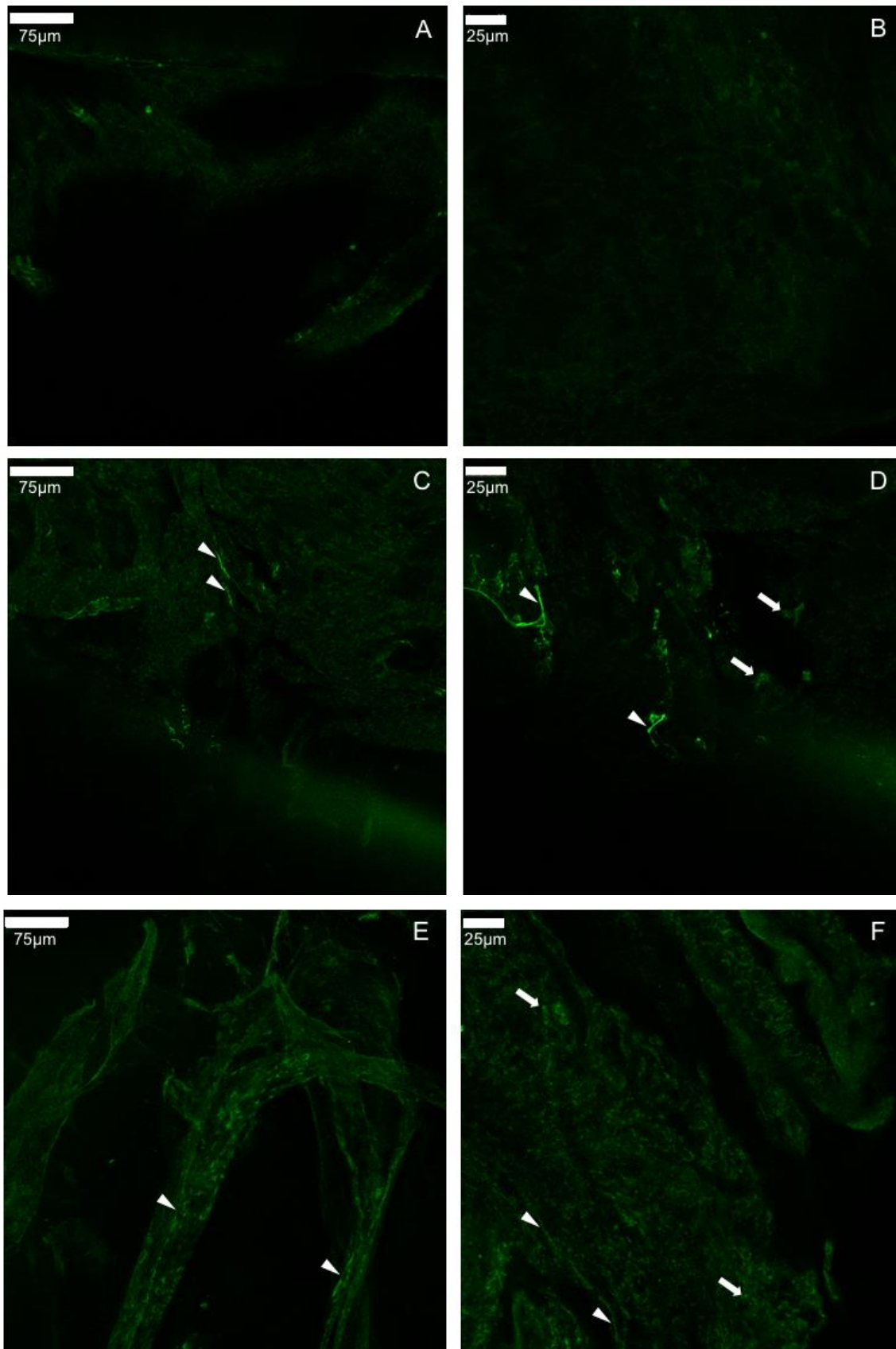


Figura 5. Inmunohistoquímica frente a β III-tubulina, 24 horas de reincubación. **A, B:** muestra control tratada con solución Ringer. **C-F:** muestras experimentales tratadas con IL-1 β . Flechas: tinción citoplásmica. Puntas de flecha: prolongaciones fibrilares. Barra de escala = 75 μ m (A, C, E); 25 μ m (B, D, F).

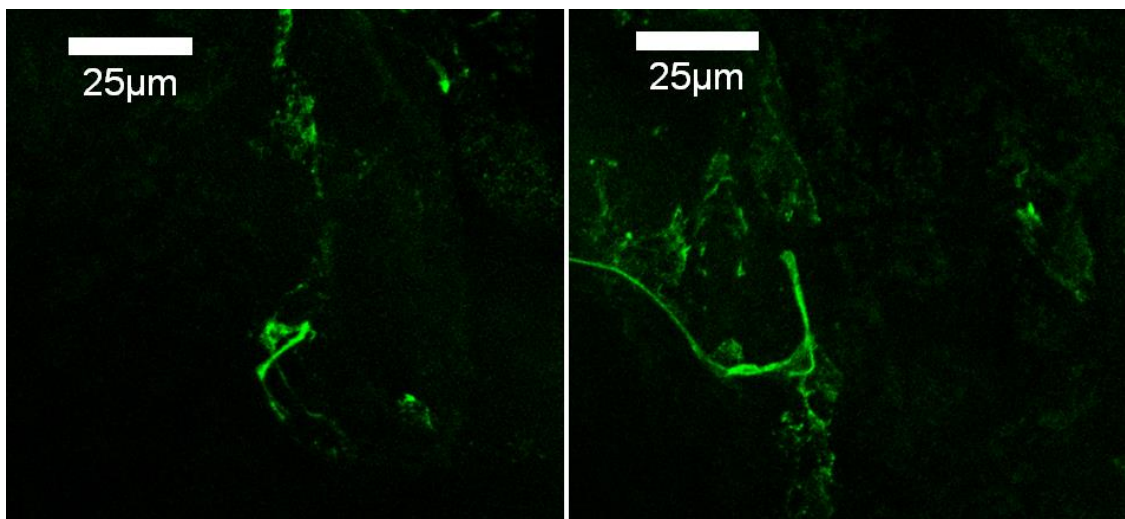


Figura 6. Inmunohistoquímica frente a β III-tubulina, 24 horas de reincubación. Detalle de *Figura 5 (D)*, prolongaciones fibrilares. Barra de escala = 25 μ m.

DISCUSIÓN

Se han realizado numerosos estudios sobre la composición del E-CSF, identificándose gran cantidad de factores presentes en el mismo (39). Muchos de estos componentes tienen funciones de diferenciación neural y, por tanto, están implicados en el proceso de neurogénesis. Como se ha comentado previamente, entre ellos se encuentra IL-1 β (3).

En este trabajo, el patrón de tinción fibrilar que muestran las células amnióticas tratadas con dicha citocina durante 24 horas puede indicar un desarrollo axonal, ya que la β III-tubulina es un marcador de diferenciación neuronal temprana (40). Esto sugiere que IL-1 β juega un importante papel como factor de diferenciación en el desarrollo temprano del sistema nervioso, habiéndose demostrado previamente que es capaz de aumentar la diferenciación de precursores nerviosos en embriones de pollo (34), además de inducir una diferenciación neural en células no nerviosas, como demuestra este trabajo.

Estudios realizados en células humanas multipotentes del hipocampo y precursores embriológicos neurales de ratón muestran que IL-1 β disminuye la diferenciación neuronal, a la vez que promueve la proliferación de células indiferenciadas (36,41). En cambio, otros trabajos sugieren que promueve la diferenciación de oligodendrocitos, a la vez que inhibe la proliferación de sus progeni-

tores (35). Además, se ha comprobado también *in vitro* que IL-1 β estimula la supervivencia de cultivos de células de médula espinal, hipocampo y porción basal del telencéfalo (42). Sin embargo, estos trabajos han sido realizados *in vitro*, por lo cual la extrapolación de los resultados es más limitada que en nuestro modelo, que es *in vivo* y con una mínima manipulación del embrión.

Nuestro trabajo abre numerosas e interesantes vías de investigación, como por ejemplo estudiar *in vivo* otros marcadores de diferenciación neuronal, como *Neuronal Nuclei* (NeuN) o *Microtubule-Associated Protein 2* (MAP2), ambos específicos para neuronas maduras (43,44), para corroborar esta diferenciación y ver el grado de madurez neuronal que se puede llegar a alcanzar.

Aparte, en futuros estudios, se podría llevar a cabo la tinción de los núcleos de las células amnióticas tratadas para identificar qué proporción de las mismas es estimulada por IL-1 β .

También sería deseable estudiar otros factores presentes en el E-CSF, analizando su capacidad para promover la diferenciación neuronal, lo cual podría ser útil en el desarrollo de nuevas terapias neuroregenerativas y para ayudarnos a comprender las funciones del E-CSF en el desarrollo temprano del SNC.

Es importante discutir las limitaciones de este trabajo. En primer lugar, con respecto al modelo elegido, las extrapolaciones a mamíferos y finalmente a la raza humana son limitadas. Por ello y, como primer paso, en futuros trabajos se podrían utilizar embriones de ratones en vez de pollos, aunque su manipulación es más complicada.

CONCLUSIÓN

En conclusión, con este trabajo se demuestra que IL-1 β promueve la neurogénesis en la membrana amniótica, un tejido no neural, en embriones de pollo *in vivo* tratados con esta citocina durante 24 horas.

Nuestro trabajo, por tanto, refuerza la idea del importante papel de IL-1 β como factor neurodiferenciador durante el desarrollo embrionario, así como su capa-

cidad para inducir transdiferenciación, es decir, favorecer la diferenciación a neuronas en células no nerviosas.

Este es un paso más en el conocimiento de las acciones de IL-1 β , del funcionamiento del E-CSF y, en último término, del desarrollo del SNC.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a Blanca Hidalgo la colaboración en la realización de los experimentos y a Sagrario Callejo su asistencia para la utilización del microscopio confocal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev Dyn.* 1 de diciembre de 1992;195(4):231-72.
2. Sadler TW. Langman. Embriología médica. 13.^a ed. Wolters Kluwer; 2016. 422 p.
3. Valsero ME, Moro JA (dir), de la Mano A (dir). Efecto neurotrófico «in vivo» del fluido cerebroespinal embrionario durante el desarrollo de la médula espinal y en células mesenquimales y amnióticas. [Tesis doctoral]. [Valladolid]: Universidad de Valladolid; 2015.
4. Zappaterra MD, Lisgo SN, Lindsay S, Gygi SP, Walsh CA, Ballif BA. A Comparative Proteomic Analysis of Human and Rat Embryonic Cerebrospinal Fluid. *J Proteome Res.* 1 de septiembre de 2007;6(9):3537-48.
5. Gato Á, Moro J a., Alonso M i., Bueno D, De La Mano A, Martín C. Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 1 de mayo de 2005;284A(1):475-84.

6. Gilbert SF. *Biología del desarrollo*. 7.^a ed. Panamericana; 2005.
7. Gato A, Desmond ME. Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent regulators of embryonic brain growth, morphogenesis and histogenesis. *Dev Biol*. 15 de marzo de 2009;327(2):263-72.
8. Gato A, Alonso MI, Martín C, Carnicero E, Moro JA, De la Mano A, et al. Embryonic cerebrospinal fluid in brain development: neural progenitor control. *Croat Med J*. agosto de 2014;55(4):299-305.
9. Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, et al. New Neurons Follow the Flow of Cerebrospinal Fluid in the Adult Brain. *Science*. 3 de febrero de 2006;311(5761):629-32.
10. Sun D, Bullock MR, McGinn MJ, Zhou Z, Altememi N, Hagood S, et al. Basic fibroblast growth factor-enhanced neurogenesis contributes to cognitive recovery in rats following traumatic brain injury. *Exp Neurol*. marzo de 2009;216(1):56-65.
11. Kawamata T, Alexis NE, Dietrich WD, Finklestein SP. Intracisternal Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Enhances Behavioral Recovery Following Focal Cerebral Infarction in the Rat: *J Cereb Blood Flow Metab*. julio de 1996;542-7.
12. Jelaso AM, Acevedo S, Dang T, Lepere A, Ide CF. Interleukin-1 β and its type 1 receptor are expressed in developing neural circuits in the frog, *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol*. 4 de mayo de 1998;394(2):242-51.
13. March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature*. 20 de junio de 1985;315(6021):641-7.
14. Weining KC, Sick C, Kaspers B, Staeheli P. A chicken homolog of mammalian interleukin-1 β : cDNA cloning and purification of active recombinant protein. *Eur J Biochem*. 15 de diciembre de 1998;258(3):994-1000.
15. Tan Q, Hu J, Yu X, Guan W, Lu H, Yu Y, et al. The Role of IL-1 Family Members and Kupffer Cells in Liver Regeneration. *BioMed Res Int* [Internet]. 2016 [citado 6 de febrero de 2017];2016. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4820608/>

16. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature*. 30 de abril de 1992;356(6372):768-74.

17. Schett G, Dayer J-M, Manger B. Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol*. enero de 2016;12(1):14-24.

18. de la Mano A, Moro JA (dir), Gato A (dir). Expresión neuroendocrina de interleuquinas 1 β y 6 durante el desarrollo embrionario: efecto sobre la proliferación y diferenciación en la médula espinal. [Tesis doctoral]. [Valladolid]: Universidad de Valladolid; 2006.

19. Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol*. agosto de 2005;5(8):629-40.

20. Santarlasci V, Cosmi L, Maggi L, Liotta F, Annunziato F. IL-1 and T Helper Immune Responses. *Front Immunol* [Internet]. 15 de julio de 2013 [citado 23 de abril de 2017];4. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3711056/>

21. Kwak A, Lee Y, Kim H, Kim S. Intracellular interleukin (IL)-1 family cytokine processing enzyme. *Arch Pharm Res*. 1 de noviembre de 2016;39(11):1556-64.

22. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest*. 1 de febrero de 2005;115(2):282-90.

23. Zwerina J, Redlich K, Polzer K, Joosten L, Krönke G, Distler J, et al. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10 de julio de 2007;104(28):11742-7.

24. Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahill GM, Sharp FA, et al. Activation of the Nlrp3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nat Immunol*. octubre de 2010;11(10):897-904.

25. del Río-Hortega P. Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglía. En: *Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural*. Madrid; 1928. (14).

26. Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 17 de abril de 2013 [citado 24 de abril de 2017];7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3627983/>
27. Deverman BE, Patterson PH. Cytokines and CNS Development. *Neuron*. 15 de octubre de 2009;64(1):61-78.
28. Licastro F, Pedrini S, Caputo L, Annoni G, Davis LJ, Ferri C, et al. Increased plasma levels of interleukin-1, interleukin-6 and alpha-1-antichymotrypsin in patients with Alzheimer's disease: peripheral inflammation or signals from the brain? *J Neuroimmunol*. 1 de febrero de 2000;103(1):97-102.
29. Howren MB, Lamkin DM, Suls J. Associations of Depression With C-Reactive Protein, IL-1, and IL-6: A Meta-Analysis. *Psychosom Med*. febrero de 2009;71(2):171-86.
30. Boutin H, Kimber I, Rothwell NJ, Pinteaux E. The expanding interleukin-1 family and its receptors: do alternative IL-1 receptor/signaling pathways exist in the brain? *Mol Neurobiol*. junio de 2003;27(3):239-48.
31. Schielke GP, Yang G-Y, Shivers BD, Betz AL. Reduced Ischemic Brain Injury in Interleukin-1 β Converting Enzyme—Deficient Mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1 de febrero de 1998;18(2):180-5.
32. Touzani O, Boutin H, LeFeuvre R, Parker L, Miller A, Luheshi G, et al. Interleukin-1 Influences Ischemic Brain Damage in the Mouse Independently of the Interleukin-1 Type I Receptor. *J Neurosci*. 1 de enero de 2002;22(1):38-43.
33. Koo JW, Duman RS. IL-1 β is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 de enero de 2008;105(2):751-6.
34. de la Mano A, Gato A, Alonso MI, Carnicero E, Martín C, Moro JA. Role of interleukin-1 β in the control of neuroepithelial proliferation and differentiation of the spinal cord during development. *Cytokine*. febrero de 2007;37(2):128-37.
35. Vela J. Interleukin-1 Regulates Proliferation and Differentiation of Oligodendrocyte Progenitor Cells.

Mol Cell Neurosci. julio de 2002;20(3):489-502.

36. Zunszain PA, Anacker C, Cattaneo A, Choudhury S, Musaelyan K, Myint AM, et al. Interleukin-1 β : A New Regulator of the Kynurenine Pathway Affecting Human Hippocampal Neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*. marzo de 2012;37(4):939-49.

37. Low CB, Liou Y-C, Tang BL. Neural differentiation and potential use of stem cells from the human umbilical cord for central nervous system transplantation therapy. *J Neurosci Res*. junio de 2008;86(8):1670-9.

38. Mohan R, Bajaj A, Gundappa M. Human Amnion Membrane: Potential Applications in Oral and Periodontal Field. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2017;7(1):15-21.

39. Parada C, Gato A, Aparicio M, Bueno D. Proteome analysis of chick embryonic cerebrospinal fluid. *PROTEOMICS*. 1 de enero de 2006;6(1):312-20.

40. Bossolasco P, Montemurro T, Cova L, Zangrossi S, Calzarossa C, Buiatitot S, et al. Molecular and phenotypic characterization of hu-

man amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res*. abril de 2006;16(4):329-36.

41. Green HF, Treacy E, Keohane AK, Sullivan AM, O'Keefe GW, Nolan YM. A role for interleukin-1 β in determining the lineage fate of embryonic rat hippocampal neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci*. marzo de 2012;49(3):311-21.

42. Mehler MF, Kessler JA. Hematolymphopoietic and inflammatory cytokines in neural development. *Trends Neurosci*. agosto de 1997;20(8):357-65.

43. Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*. 2015;7(2):42-7.

44. Soltani MH, Pichardo R, Song Z, Sangha N, Camacho F, Satyamoorthy K, et al. Microtubule-Associated Protein 2, a Marker of Neuronal Differentiation, Induces Mitotic Defects, Inhibits Growth of Melanoma Cells, and Predicts Metastatic Potential of Cutaneous Melanoma. *Am J Pathol*. junio de 2005;166(6):1841-50.

INTERLEUCINA-1 β ESTIMULA LA NEUROGÉNESIS EN CÉLULAS AMNIÓTICAS *IN VIVO*

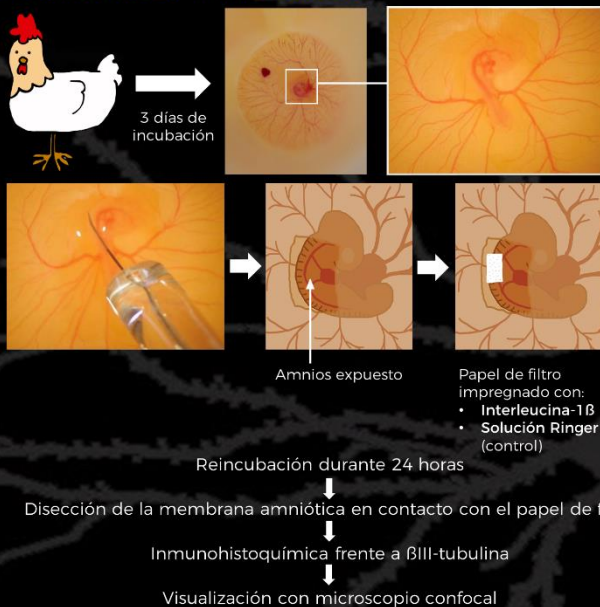
Irene Carretero del Barrio, Aníbal de la Mano Bonín

Departamento de Anatomía y Radiología, Área de Anatomía y Embriología Humanas, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid

INTRODUCCIÓN

El desarrollo temprano del sistema nervioso central comienza con el engrosamiento del ectodermo y la formación de la placa neural, constituyendo sus bordes los pliegues neurales. Dichos pliegues se acaban fusionando en la línea media y originan el tubo neural que, al cerrarse, contiene el fluido cerebroespinal embrionario. Este tiene un papel clave en el desarrollo y la diferenciación neural, con una compleja composición en la que se hallan proteínas, lípidos, hormonas, factores de crecimiento y factores de diferenciación; incluyéndose entre ellos la interleucina-1 β . Esta es una citocina pro-inflamatoria con diversas funciones, entre las que se encuentran la diferenciación y la proliferación nerviosa. Con este trabajo se pretende averiguar si la interleucina-1 β es capaz de promover la diferenciación neural en la membrana amniótica, un tejido de naturaleza no nerviosa, en embriones de pollo *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS



Controles		Interleucina-1 β	
Válidos	Desechados	Válidos	Desechados
3	1	4	1

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Estudios sobre la composición del fluido cerebroespinal embrionario han identificado numerosos factores con funciones de diferenciación neural, como la interleucina-1 β . La β III-tubulina es un marcador de diferenciación neuronal temprana, por lo que el patrón fibrilar que muestran las células amnióticas tratadas con esta citocina puede indicar un desarrollo axonal. De esta forma, se sugiere que la interleucina-1 β juega un importante papel como factor de diferenciación en el desarrollo del sistema nervioso, aunque debido al modelo elegido la extrapolación de los datos a mamíferos ha de realizarse con cautela. Este trabajo abre interesantes vías de investigación, como el estudio de otros marcadores de diferenciación neural para ver el grado de madurez que se llega a alcanzar o la capacidad de otros factores presentes en el fluido cerebroespinal embrionario de promover esta diferenciación neural. En conclusión, con este trabajo se refuerza la idea del papel de la interleucina-1 β como factor neuro-diferenciador durante el desarrollo embrionario, así como su capacidad para inducir transdiferenciación, es decir, favorecer la diferenciación a neuronas en células no nerviosas.

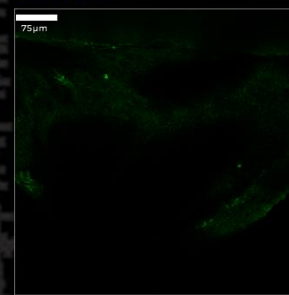
REFERENCIAS

- de la Mano A, Moro JA (dir), Gato A (dir). Expresión neuroendocrina de interleuquinas 1 β y 6 durante el desarrollo embrionario: efecto sobre la proliferación y diferenciación en la médula espinal. [Tesis doctoral]. [Valladolid]: Universidad de Valladolid; 2006.
- Gato Á, Moro J a, Alonso M i, Bueno D, De La Mano A, Martín C. Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 1 de mayo de 2005;284A(1):475-84.
- Valsero ME, Moro JA (dir), de la Mano A (dir). Efecto neurotrófico «in vivo» del fluido cerebroespinal embrionario durante el desarrollo de la médula espinal y en células mesenquimales y amnióticas. [Tesis doctoral]. [Valladolid]: Universidad de Valladolid; 2015.
- Parada C, Gato A, Aparicio M, Bueno D. Proteome analysis of chick embryonic cerebrospinal fluid. *PROTEOMICS*. 1 de enero de 2006;6(1):312-20.
- de la Mano A, Gato A, Alonso MI, Carnicero E, Martín C, Moro JA. Role of interleukin-1 β in the control of neuroepithelial proliferation and differentiation of the spinal cord during development. *Cytokine*. Febrero de 2007;37(2):128-37.

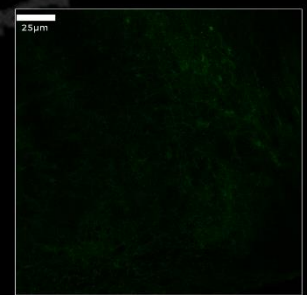


RESULTADOS

Controles



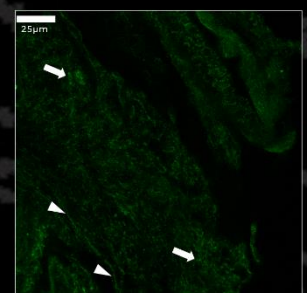
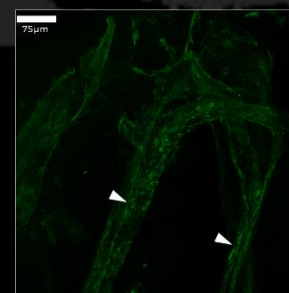
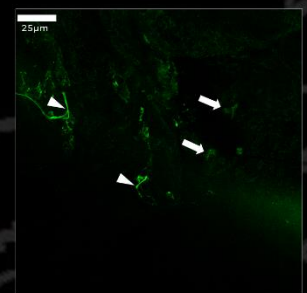
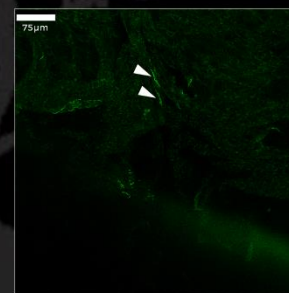
Sin tinción positiva frente a β III-tubulina



Tratamiento con interleucina-1 β

➔ Tinción citoplásmica de β III-tubulina

➤ Prolongaciones fibrilares de β III-tubulina



CONTACTO

Irene Carretero
irene.carretero.barrio@gmail.com