



MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER



Universidad de Valladolid

**Neurogénesis en el hipocampo:
Caracterización de un nicho periventricular
de células madre neurales.**

Tutor: Dr. Ángel Gato Casado.

Alumna: María Eugenia Fraile Bethencourt.

Primero, y antes que nada, quiero agradecer a cada una de las personas que de un modo u otro han hecho posible la realización de este trabajo.

ABREVIATURAS

- ZSV: Zona subventricular
- ZSG: Zona subgranular
- eCSF: Fluido cerebro-espinal embrionario
- LCR: Líquido cefaloraquídeo
- BrdU: Bromodeoxiuridina
- dc: Doblecortina
- tub: β III-tubulina

Índice

INTRODUCCIÓN	3
INTRODUCCIÓN A LA NEUROGÉNESIS.....	3
LAS CÉLULAS MADRE DEL CEREBRO DESDE EL PUNTO DE VISTA ONTOGÉNICO.....	4
EL COMPORTAMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE NEURALES DEL CEREBRO ADULTO DEPENDE DEL “NICHOS CELULARES”.....	5
HIPÓTESIS.....	8
OBJETIVO.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
TÉCNICAS UTILIZADAS.....	10
SOLUCIONES.....	13
METODOLOGÍA.....	14
RESULTADOS	16
EXISTEN CÉLULAS BRDU ⁺ EN EL ENTORNO DE LA PROLONGACIÓN INFERIOR DEL VENTRÍCULO LATERAL Y EN LA PARTE INFERIOR DE CA3.....	16
LAS CÉLULAS QUE SE REPLICAN SUFREN UN PROCESO DE MIGRACIÓN Y DIFERENCIACIÓN NEUROGÉNICA.....	21
OBSERVAMOS UNA POSIBLE ASOCIACIÓN/DEPENDENCIA ENTRE LAS CÉLULAS BRDU ⁺ Y LOS VASOS O EL VENTRÍCULO.....	23
EXISTEN CÉLULAS BRDU ⁺ EN EL LADO OPUESTO DEL VENTRÍCULO.....	24
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28

Introducción

El presente Trabajo de Fin de Máster aborda un tema de investigación de importancia y actualidad como es el estudio de la neurogénesis en el cerebro adulto.

En la introducción empezaremos definiendo la neurogénesis en el cerebro adulto, seguiremos con un recorrido desde las primeras etapas del desarrollo hasta las células madre adultas y finalizaremos con la definición de nicho y su repercusión en este proceso. De esta forma, trataremos de fundamentar la hipótesis y los objetivos a desarrollar en este trabajo.

Introducción a la neurogénesis

El cerebro es el órgano más importante y complejo en mamíferos, es un entramado de neuronas y glia (astrocitos, oligodendrocitos y microglía) capaz de regular y coordinar la actividad de un organismo completo, incluyendo su relación con el entorno. Las neuronas transmiten información, mediante potenciales de acción y neurotransmisores, a otras neuronas, músculos o glándulas. Los astrocitos tienen un papel estructural y de soporte, ayudando a la función y supervivencia de las neuronas. Los oligodendrocitos son los encargados de formar la mielina que recubre los axones de las neuronas del Sistema Nervioso Central, esta es fundamental para la transmisión del impulso eléctrico. Y la microglía es clave en la eliminación de residuos y en la respuesta inmune en el Sistema Nervioso.

Dada la complejidad de su estructura, hasta hace relativamente poco, se consideraba imposible la formación de nuevas células neuronales que se integrasen en el sistema después del desarrollo postnatal. Sin embargo, en la década de los 60, Josef Atlman encontró las primeras evidencias de la formación de nuevas neuronas en el cerebro de roedores adultos ^[1]. Aunque en un principio su teoría fue descartada, en los años 90 se demostró la existencia de células en el cerebro de mamífero que aisladas y puestas en cultivo, eran capaces de formar astrocitos y neuronas ^[2].

Actualmente, y tras múltiples trabajos de investigación, se conocen dos áreas privilegiadas del cerebro adulto en las cuales la formación de nuevas células neuronales continúa de forma fisiológica durante la vida adulta: la zona subventricular (ZSV) y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo.

El proceso por el cual se crean nuevas células neuronales del Sistema Nervioso a partir de células progenitoras se conoce como “**neurogénesis**”.

La nomenclatura utilizada para el estado de diferenciación, la capacidad de autorreplicación y la potencialidad diferenciadora de estas “células precursoras” del Sistema Nervioso lleva muchas veces a errores y confusiones. Por esto, cabe aclarar el significado de cada uno de los términos empleados ^[3] (fig. 1):

- Las **células madre neurales** tienen capacidad de replicación, autorrenovación y diferenciación a progenitores neurales.
- Los **progenitores neurales** pueden replicarse y diferenciarse bien a progenitores gliales (glioblastos) o bien a progenitores neuronales (neuroblastos). Sin embargo no tienen capacidad de autorrenovación.
- Los **glioblastos** darán lugar a las células gliales: astrocitos u oligodendrocitos.
- Los **neuroblastos** darán lugar a neuronas.

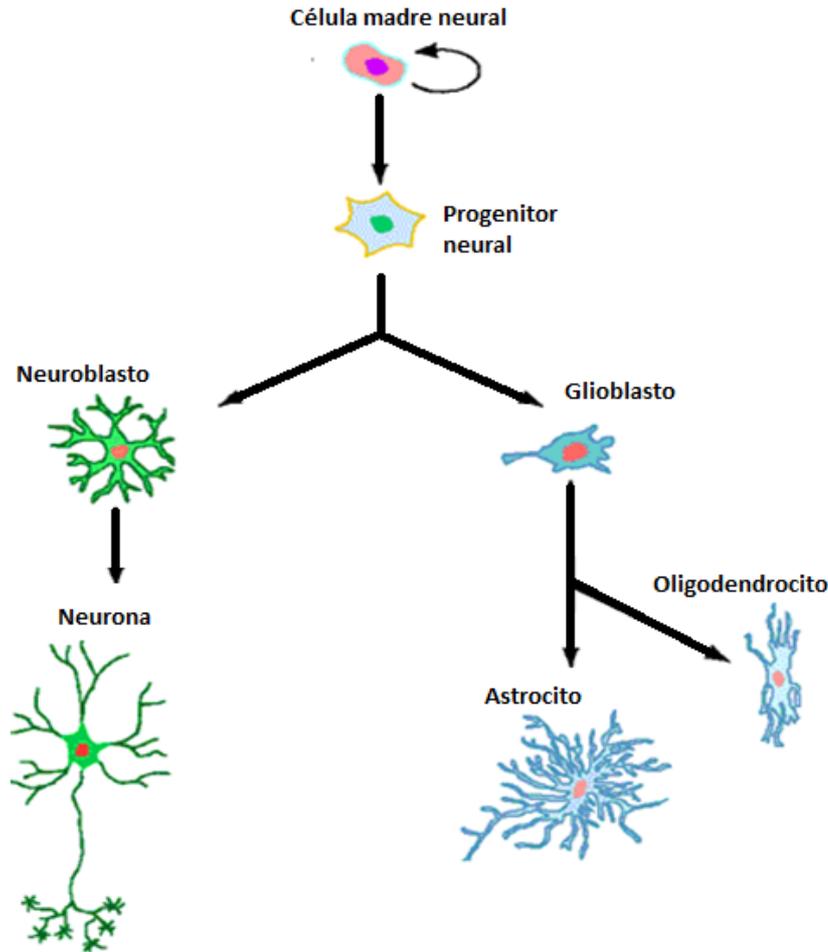


Figura 1. Esquema de la jerarquía celular en el Sistema Nervioso adulto.

Las células madre del cerebro desde el punto de vista ontogénico.

Las primeras células madre neurales aparecen durante la tercera semana del desarrollo embrionario formando la placa neural, que posteriormente dará lugar a una estructura tubular llamada tubo neural compuesta por una pared neuroepitelial que rodea a una cavidad repleta de fluido cerebro-espinal embrionario (eCSF). En la parte cefálica del tubo neural tiene lugar un proceso de expansión y vesiculación durante el cual se forma el primer esbozo del cerebro con sus tres subdivisiones esenciales: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. El neuroepitelio que rodea la cavidad está compuesto por una homogénea población de células madre neurales que son las responsables de la formación del cerebro adulto. Durante los primeros estadios del desarrollo, las células neuroepiteliales sufren una intensa actividad replicativa con mitosis simétricas, aumentando el *pool* de células madre neurales. En estadios más tardíos del desarrollo neural, empiezan las divisiones asimétricas que darán lugar a los progenitores de las líneas neurales. De este modo los progenitores neuronales formarán neuronas, y los progenitores gliales formarán astrocitos y oligodendrocitos.

En todo este proceso de expansión y crecimiento del cerebro embrionario juega un papel esencial el fluido que ocupa las cavidades. Este fluido se conoce con el nombre de fluido cerebro-espinal embrionario (eCSF) y es rico en: iones; factores de transcripción; proteoglicanos, entre los que destaca el condroitin-sulfato; citoquinas como IL-1 β e IL-6; factores de crecimiento como FGF2 y EGF; ácido retinoico; apolipoproteínas; y vitaminas. Este

fluido ha demostrado jugar un papel clave en la regulación del comportamiento de los precursores neurales neuroepiteliales ^{[4][5]}.

El destino final del CSF-e es convertirse en líquido cefalorraquídeo (LCR), aunque en el proceso cambia su composición y pierde muchos de sus compuestos, y con ellos muchas de sus propiedades.

A lo largo del desarrollo, las células neuroepiteliales van desapareciendo, aunque en la actualidad sabemos que una parte de esta población persiste como células de la glia radial y finalmente como astrocitos que conservan las dos propiedades fundamentales de las células madre: autorrenovación y multipotencia. En el mantenimiento de estas características juega un papel esencial el microentorno o nicho donde residen las células madre en el cerebro adulto, hasta el momento sólo encontradas en las dos localizaciones antes mencionadas: ZSV y ZSG del giro dentado del hipocampo.

El comportamiento de las células madre neurales del cerebro adulto depende del “nicho celular”.

A pesar de que se han encontrado células con capacidad proliferativa en diversas áreas del Sistema Nervioso adulto, sólo se ha demostrado la existencia de células con la capacidad de formar nuevas neuronas en la ZSV y la ZSG del giro dentado del hipocampo. La explicación a este fenómeno la encontramos en el microentorno específico, o nicho neurogénico, que rodea a las células en estas dos zonas.

Un nicho es un microentorno especializado encargado de promover y mantener la autorrenovación de las células madre, así como su diferenciación. Se trata de estructuras dinámicas capaces de modificar sus características en función de las necesidades del tejido. En ellos, las células madre están sometidas a interacciones con otras células del tejido y a la recepción de señales difusibles del entorno a través de la matriz extracelular. Además suelen estar íntimamente asociadas a células endoteliales y ancladas a la lámina basal. La lámina basal es fundamental para la orientación de la división celular, además regula el paso de factores de crecimiento y otras señales. Otro elemento clave en el nicho son los vasos sanguíneos, los cuales transportan factores esenciales de regulación celular^[6]. En el caso del Sistema Nervioso Central es esencial el contenido de las cavidades ventriculares, que ha demostrado jugar un importante papel en la ZSV, siendo un componente vital del nicho neurogénico ^{[4][5]}.

En la ZSV, el nicho de células madre neurales se encuentran lindando con la pared lateral del ventrículo lateral en su parte más anterior. Estas células son astrocitos con capacidad de autorrenovación y multipotencialidad derivados de la glia radial embrionaria, que se replican y emigran por el estriatum hacia la Banda Migratoria Rostal que las conduce hasta el bulbo, donde se diferencian en interneuronas (fig. 2).

La ZSV es una región originada a partir del neuroepitelio embrionario, está formada por una población heterogénea de células implicadas en el proceso de neurogénesis (células madre neurales, progenitores neurales, glioblastos y neuroblastos)^[7]. Las células madre neurales de la ZSV han sido ampliamente caracterizadas, y se ha demostrado tanto su capacidad de autorrenovación como su multipotencia ^[8].

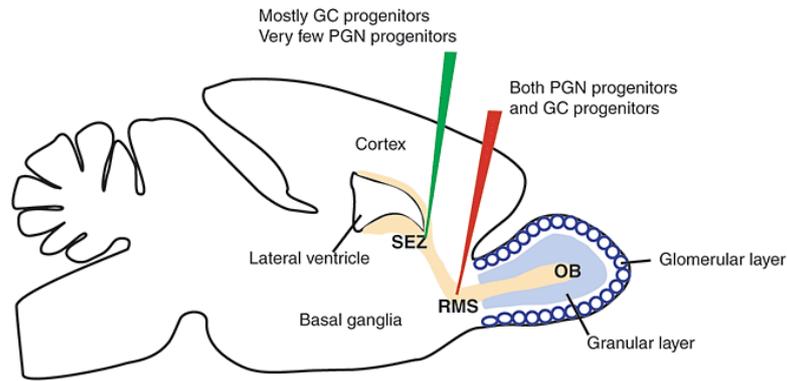


Figura 2. El cerebro adulto de roedor posee células madre neurales en la zona subventricular (SEZ) que migran como una corriente rostral (RMS) hasta el bulbo olfatorio (OB). A medida que avanzan, los precursores van diferenciándose, primero a neuroblastos y finalmente se integran en el bulbo como interneuronas. (GC: granule cells; PGN: periglomerular neuron). *Nature Neuroscience* **8**, 846 - 848 (2005).

Por otro lado, en el hipocampo está ampliamente asumido que el nicho neurogénico está en la ZSG del giro dentado del hipocampo, entre la capa granular del giro dentado y el hilus (fig. 3). La capa granular del giro dentado está compuesta principalmente por neuronas activadoras primarias, encargadas de funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje [9].

Según el modelo más ampliamente aceptado, en la ZSG, las células precursoras, que se encuentran como astrocitos radiales, sufren un proceso de diferenciación hasta neuronas, pasando por neuroblastos; al mismo tiempo migran hacia la capa granular donde, una vez completada la diferenciación neuronal, establecen conexiones con CA3^[10]. La neurogénesis en la ZSG ocurre en paralelo con la angiogénesis, de modo que las células endoteliales sirven de soporte a las células precursoras^[11].

No obstante, estos precursores de la ZSG, aunque son capaces de formar nuevas neuronas y glía, no tienen capacidad de autorrenovación^{[12][13]}. Por tanto, no se les puede considerar células madre neurales, ya que estas deben de ser capaces de replicarse, diferenciarse a varios tipos de células neurales y autorrenovarse.

La carencia de células autorrenovables en la ZSG hace pensar en que, posiblemente, el nicho descrito hasta ahora esté incompleto, y por tanto, en la posibilidad de la existencia de un nicho de células madre hipocámpales más amplio, en el cual se encuentre el lugar de activación y autorreplicación de las células madre neurales del hipocampo.

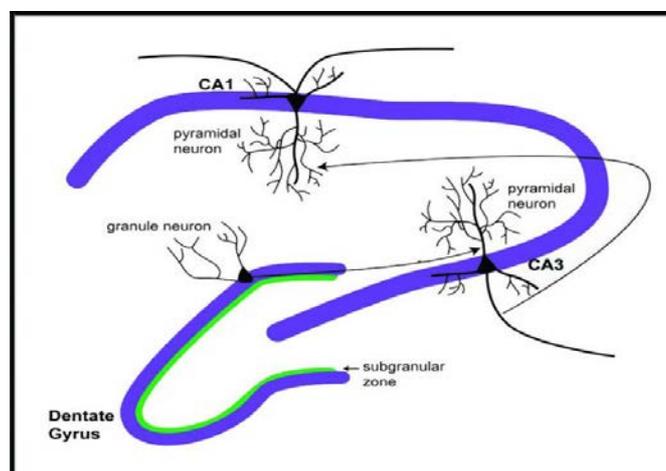


Figura 3. Neuronas del hipocampo y la zona subgranular del giro dentado. *J Neurobiol.* 2006 Jun; **66**(7):780-91.

Actualmente se acepta como requisito común a todas las zonas con actividad neurogénica el concepto de que dicha actividad está condicionada por el entorno, es decir, por el nicho celular. Por tanto, dado que sólo se ha encontrado actividad neurogénica en la ZSV y en la ZSG del giro dentado del hipocampo, cabe suponer que la estructura y dinámica de ambos nichos deben ser comunes en ambas localizaciones.

A pesar de que existen notables similitudes entre los componentes del nicho de la ZSV y de la ZSG, hay una discordancia en uno de los factores: el LCR (fig.4 y fig. 5). El LCR juega un papel clave en la neurogénesis^[4], que si bien ha sido demostrado en la ZSV, no existe aparentemente en el caso del hipocampo, ya que la ZSG del giro dentado no guarda relación directa con las cavidades ventriculares del cerebro adulto.

Respecto a este concepto, se ha planteado la existencia de un nicho hipocampal más amplio, en el que una de las partes estaría situada en la proximidad de la superficie de la prolongación inferior del ventrículo lateral, donde se alojarían las células madre neurales y donde se desarrollaría su actividad replicativa y de autorrenovación. De este modo, al igual que ocurre en la ZSV con el proceso migratorio rostral, los precursores hipocampales migrarían desde la pared de la prolongación inferior del ventrículo lateral hacia la ZSG del giro dentado^[14]. Sin embargo, esta teoría que equipara ambos sistemas, requiere el aporte de evidencias experimentales.

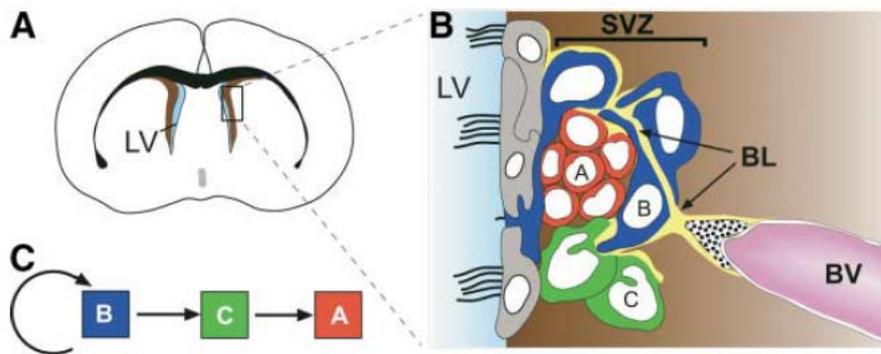


Figura 4. Nicho neurogénico en la zona subventricular (ZSV) del cerebro adulto. **A)** Sección coronal de un cerebro de ratón adulto a nivel de la zona subventricular. El ventrículo lateral está representado en azul. **B)** Arquitectura de la ZSV. En azul están representadas las células madre neurales (B), algunas de estas células tienen un único cilio que está en contacto con el fluido cerebroespinal. En verde, las células C, se dividen rápidamente dando lugar a una amplificación transitoria de células derivadas de B. En rojo se representan los neuroblastos migratorios que van a migrar hacia al bulbo olfatorio, donde se convertirán en interneuronas. Están representados también los componentes esenciales del nicho: vaso sanguíneo (BV), la lámina basal (BL), células ependimales (gris). **C)** Linaje celular en la ZSV. *Neuron* 41, 683–686, March 4 (2004).

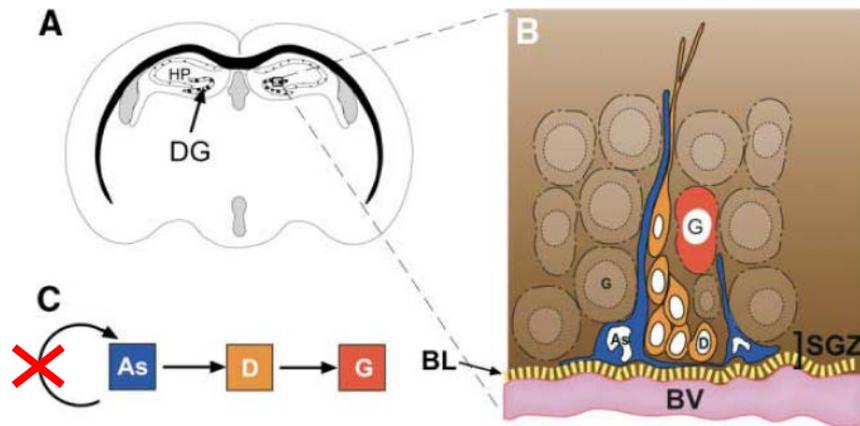


Figura 5. Nicho neurogénico en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo de ratón adulto. **A)** Sección coronal de un cerebro de ratón adulto a nivel del hipocampo. **B)** Arquitectura de la ZSG. Los astrocitos (azul) actúan como células precursoras dando lugar a células progenitoras (naranja) que terminan por diferenciarse en neuronas de la capa granular (rojo). En rosa aparece representado un vaso sanguíneo. **C)** Linaje celular de la ZSG (modificada). *Neuron* 41, 683–686, March 4 (2004).

Hipótesis

Dado que no se han encontrado células con capacidad de autorrenovación en la ZSG del giro dentado, y que esta capacidad es necesaria para el mantenimiento del *pool* de células madre, cabe pensar la existencia de un nicho neurogénico más amplio, con una zona de activación y autorreplicación de células madre neurales.

Puesto que la ZSG del giro dentado y la ZSV son las únicas regiones del Sistema Nervioso en las que se ha demostrado actividad neurogénica, es probable que las células del nicho neurogénico de ambas regiones tengan una dinámica y unos componentes similares.

El nicho de la ZSV se encuentra en una zona adyacente al ventrículo, en contacto con el LCR, un elemento esencial en el proceso de neurogénesis, que actúa proporcionando señales de supervivencia, replicación y proliferación a las células adyacentes al ventrículo. Por tanto, es posible que, en el caso del hipocampo, el nicho de células madre se encuentre también en contacto con este fluido.

La hipótesis sobre la que trabajamos es la existencia de un nicho complejo formado por la ZSG y una zona replicativa próxima a la prolongación inferior del ventrículo lateral, en la que las células precursoras estén en contacto con el LCR y desde la cual puedan migrar hacia el giro dentado del hipocampo.

Objetivo

El objetivo de este proyecto es tratar de corroborar la hipótesis anteriormente expuesta evidenciando la presencia de células madre neurales con intensa actividad replicativa en las proximidades de la pared del ventrículo lateral, así como demostrar su proceso migratorio hasta el giro dentado del hipocampo.

Materiales y métodos

El diseño experimental expuesto a continuación trata de demostrar la hipótesis anteriormente propuesta. Todos los experimentos se basan en la búsqueda de una región periventricular en la cual las células madre neurales que se repliquen y migren hacia el giro dentado del hipocampo, así como en la identificación de su ruta de migración y diferenciación.

En este proyecto, el estudio de la neurogénesis endógena del ratón adulto está compuesto, principalmente, por dos tipos de experimentos:

- Experimentos basados en la incorporación de nucleótidos análogos durante la división celular.

La bromodeoxiuridina (BrdU) es un análogo sintético de la Timina capaz de incorporarse a las células durante la fase de síntesis de DNA en la mitosis. Esto permite identificar, mediante anticuerpos anti-BrdU, las células que se hayan dividido o que se estén dividiendo desde el momento de la aplicación hasta el sacrificio del animal.

De esta manera, podemos estudiar la proliferación celular en el hipocampo de ratones adultos. Dadas las características del Sistema Nervioso, salvo las células relacionadas con los vasos sanguíneos, las células que incorporen BrdU proceden de células madre neurales, pues son las únicas con actividad replicativa.

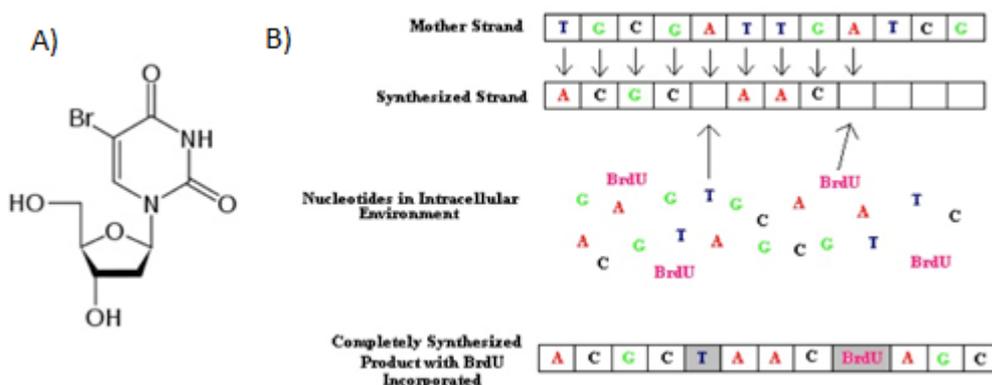


Figura 6. A) Estructura química de la Bromodeoxiuridina. **B)** Integración de BrdU durante la síntesis de DNA. Imágenes obtenidas de la web “Neurogenesis. NEUR 401 Advanced Neuroscience” (<https://sites.lafayette.edu/neur401-sp10/>).

- Experimentos basados en la expresión de marcadores específicos.

Los diferentes estadios de diferenciación celular pueden ser identificados por la expresión de determinadas moléculas que se pueden identificar mediante el uso de anticuerpos específicos. En este caso utilizamos anticuerpos contra doblecortina para neuroblastos migratorios y contra β III-tubulina para neuronas.

- Doblecortina (dc): es una proteína asociada a microtúbulos, necesaria para la correcta migración neural^[15]. La expresión de doblecortina es particularmente elevada durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, en el cerebro adulto continúa siendo elevada en dos áreas: el hipocampo y la ZSG. La doblecortina presenta un patrón de expresión transitorio, es decir, los neuroblastos comienzan a expresar doblecortina cuando comienzan a dividirse, esta expresión es máxima

mientras migran y va disminuyendo hasta que desaparece en neuronas maduras ^[16]. En definitiva, se usa como marcador de neuroblastos en proceso de migración.

- β III-tubulina (tub): es una isoforma de las proteínas globulares llamadas tubulinas. Estas proteínas se ensamblan para dar lugar a los microtúbulos. La β III-tubulina se encuentra exclusivamente en neuronas, y por ello se usa como marcador neuronal. Esta proteína se expresa en estadios tempranos de diferenciación neuronal, siendo una de los primeros marcadores neuronales específicos, antes incluso que las proteínas responsables de la extensión de neuritas ^[17]. En definitiva, la β III-tubulina marca neuronas desde los primeros estadios de diferenciación.

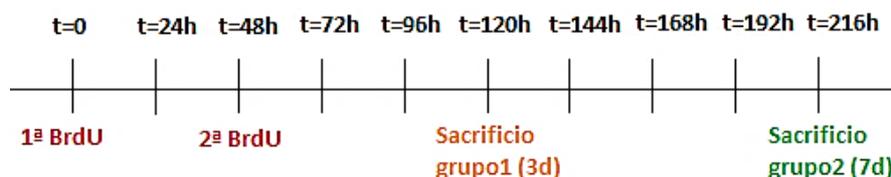
Técnicas utilizadas

Los animales utilizados fueron tratados de acuerdo con el Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

- Tratamiento con BrdU.

La incorporación de BrdU al organismo de los animales se realizó mediante inyecciones intraperitoneales. Administramos dos dosis de 0,1ml de BrdU (3,03g/l), con 48 horas de diferencia entre ellas.

Llevamos a cabo dos tratamientos con dos grupos de ratones en los que variamos el tiempo de exposición a BrdU. En el primero los animales estuvieron expuestos a BrdU durante 120 horas, es decir, fueron sacrificados tres días después de la última dosis. En el segundo, los animales estuvieron expuestos a 216 horas de BrdU, es decir, fueron sacrificados siete días después de la última dosis.



- Extracción de cerebro de ratón adulto.

Los ratones fueron sacrificados mediante la administración de sedante y analgésico a una dosis letal: 0,18ml Imalgene® 1000; 0,07ml Rompun®. Tras unos minutos, es necesario confirmar la muerte mediante la comprobación de ausencia de reflejos corneales. Para la extracción del cerebro decapitamos al animal *post mortem*. En este punto abrimos el cráneo, con mucho cuidado de no dañar el tejido cerebral, y extraemos el cerebro del animal, que, inmediatamente, se sumerge en Ringer a 4°C. Todo el procedimiento se lleva a cabo con material quirúrgico esterilizado.

- Preparación histológica.

Para la preparación histológica del tejido seguimos un protocolo en cinco pasos: fijación, deshidratación, aclarado, inclusión y formación de bloques.

En primer lugar, para la fijación del tejido, introducimos los cerebros en solución de Carnoy durante 5 horas. El siguiente paso es la deshidratación, la cual llevamos a cabo mediante pases por alcoholes. El primero es alcohol de 96°, en él, los cerebros se dejan durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, dividimos el cerebro en dos mitades con una cuchilla estéril. Realizamos el

corte longitudinalmente, siguiendo la línea que divide los dos hemisferios. Entonces, damos dos pases por alcohol de 100º de 4 horas cada uno (en agitación). Una vez deshidratado, llevamos a cabo el aclarado con xilol, dos pases de 1 hora cada uno (en agitación). Después realizamos la inclusión del tejido en parafina, para ello sumergimos los semiceberos en parafina líquida y los dejamos durante toda la noche a 60ºC. Por último formamos los bloques, que más tarde cortamos en secciones de 8µm.

- **Realización de cortes.**

Cortamos los bloques de parafina con un microtomo en secciones de 8µm que recogimos en portas tratados con 3-aminopropil-trietoxisilano. Una vez terminado el tejido, introducimos los portas en la estufa y los dejamos secar durante 24 horas a 37ºC.

Finalmente, examinamos cada uno de los cortes bajo el microscopio para seleccionar secciones apropiadas de giro dentado. Como guía para el reconocimiento de las secciones utilizamos un atlas estereotáxico (*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Franklin & Paxinos*).

- **Inmunohistoquímica.**

La técnica inmunohistoquímica combina elementos inmunológicos, histológicos y bioquímicos que permiten detectar un antígeno y ubicarlo histológicamente en una muestra determinada.

Durante el proyecto, llevamos a cabo las siguientes técnicas inmunohistoquímicas:

a) BrdU/hematoxilina:

El primer paso fue la desparafinación de las secciones mediante dos pases de 10 minutos por xilol, y posteriormente dos pases de 7 minutos por los siguientes alcoholes: 100º, 96º, 80º y 50º. Después lavamos las muestras con agua corriente (15 minutos).

El siguiente paso fue la desnaturalización o desenmascaramiento antigénico, con el que conseguimos que la BrdU quede accesible, y pueda unirse al anticuerpo. Conseguimos la desnaturalización incubando las secciones en ácido clorhídrico (HCl) 2M a 37ºC durante 1 hora. Después procedimos a inactivar la peroxidasa endógena incubando la muestra durante 10 minutos en alcohol etílico con 0,02ml de HCl.

A continuación lavamos con agua destilada y tras 3 pases por buffer Tris de 5 minutos, neutralizamos la muestra con buffer borato 0,1M pH 8,5 (10 minutos); después, volvimos a lavar con agua destilada y buffer Tris (3 veces).

Seguidamente, realizamos una segunda inactivación de la peroxidasa endógena sometiendo a la muestra a una solución de H₂O₂ al 3% en metanol, durante 15 minutos. Pasado el tiempo de incubación realizamos tres lavados en buffer Tris de 5 minutos cada uno.

En este momento se procede al inmunomarcado. Para marcar la BrdU utilizamos, como anticuerpo primario, un anticuerpo monoclonal anti-BrdU de ratón (Monoclonal Mouse Anti-Bromodeoxyuridine, Dako) dilución 1:100 en buffer Tris. Añadimos la dilución a la muestra se deja incubando toda la noche a 4ºC en cámara húmeda.

Al día siguiente realizamos tres lavados de 5 minutos con buffer Tris, y añadimos el anticuerpo secundario (goat anti-mouse, Mouse ExtrAvidin® Peroxidase Staining Kit, Sigma) dilución 1:20 en buffer Tris, y lo dejamos incubando durante 30 minutos.

A continuación, tras tres lavados con buffer Tris, incubamos las muestras con Extravidina Peroxidasa (Mouse ExtrAvidin® Peroxidase Staining Kit, Sigma) dilución 1:20 en buffer Tris durante 10 minutos.

Pasado el tiempo de incubación, llevamos a cabo el revelado con diaminobencidina (DAB, Sigma). Una vez obtenido el resultado deseado, detuvimos el revelado con agua destilada y procedimos a la contratinción con hematoxilina. Por último montamos los portas con medio acuoso.

b) β III-tubulina/BrdU:

A diferencia del caso anterior, esta es una inmunohistoquímica con fluorocromos para detectar dos antígenos simultáneamente, luego el protocolo para llevarla a cabo presenta algunas variaciones. En ambos casos, β III-tubulina y doblecortina, el procedimiento es el mismo, simplemente varía la dilución de los anticuerpo primarios.

El primer paso, como en el caso anterior, es la desparafinación de las muestras mediante dos pases por xilol de 8 minutos cada uno, y posteriormente, dos pases de 8 minutos por los siguientes alcoholes: 100%, 96%, 80% y 50%. Después lavamos las muestras, primero con agua corriente (15 minutos) y luego con agua destilada (5 minutos).

El siguiente paso es el desmascaramiento antigénico a través de la incubación en HCl durante 1 hora a 37°C.

Pasado el tiempo de incubación, neutralizamos con buffer borato y lavamos. En este momento añadimos los anticuerpos primarios. Se utilizaron dos anticuerpos primarios: anti- β III-tubulina de conejo (Sigma) dilución 1:100 y anti-BrdU de ratón (Dako) dilución 1:100. Ambas diluciones en buffer Tris.

Una vez hemos añadido los anticuerpos, se los dejamos incubando toda la noche en cámara húmeda a 4°C.

Al día siguiente realizamos tres lavados en buffer Tris de 5 minutos cada uno, y añadimos los anticuerpos secundarios: Alexa Fluor 594 goat anti-mouse (red) y Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (green), ambos diluidos 1:1000 en buffer Tris. De esta forma, al observar la muestra en el microscopio confocal, la BrdU se verá como un marcaje nuclear rojo y la β III-tubulina se verá como un marcaje citoplasmático verde.

Una vez hemos añadido los anticuerpos secundarios, los dejamos incubando durante 1 hora en cámara húmeda y en oscuridad, a temperatura ambiente.

Por último, lavamos con agua destilada para eliminar el exceso de anticuerpo, y realizamos el montaje con Flouromount (Sigma), un medio acuoso específico para fluorescencia.

c) Doblecortina/BrdU:

El procedimiento para la inmunohistoquímica de doblecortina/BrdU es idéntico al de β III-tubulina/BrdU, exceptuando el marcaje para doblecortina, que se realiza con un anticuerpo diferente .

Para el caso de doblecortina/BrdU se utilizó como anticuerpo primario anti-doblecortina de conejo (Abcam) dilución 1:1000 en buffer Tris.

El resto del procedimiento es exactamente el mismo que en el caso anterior.

- **Contaje de células BrdU⁺**

Realizamos el contaje mediante imágenes de las secciones marcadas con BrdU/hematoxilina. Tomamos 40 imágenes de cada una de las zonas a estudiar, y contamos el número de células que habían incorporado BrdU.

Del primer grupo de ratones, los sacrificados tras tres días de la última dosis de BrdU, obtuvimos imágenes de siete cerebros. Mientras que del segundo grupo, los sacrificados tras siete días de la última dosis de BrdU, obtuvimos las imágenes de tres cerebros.

Las imágenes se obtuvieron con microscopía convencional utilizando el objetivo 20x.

Es importante recalcar la presencia de vasos sanguíneos, que también aparecen marcados, pues los eritrocitos contienen peroxidasa, enzima que reacciona con el anticuerpo secundario dando el color marrón característico de este tipo de inmunohistoquímicas. Además, las células hematopoyéticas están en continua división, luego las células nucleadas de la sangre incorporan también BrdU.

En el contaje se realizó teniendo en cuenta este hecho, y diferenciando entre tejido nervioso y vasos (fig. 7).



Figura 7. Giro dentado inferior del hipocampo de ratón adulto marcado con BrdU/hematoxilina (aumento 20x). Dentro del círculo rojo se observa una célula que ha incorporado BrdU. Fuera de este se observan estructuras vasculares marcadas con BrdU.

- **Análisis estadístico**

Realizamos el análisis estadístico utilizando el programa *Statgraphics*.

Para comparar dos muestras entre sí, las del primer grupo de ratones con las del segundo, utilizamos la prueba-t con un intervalo de confianza del 95%.

Soluciones

Buffer de Ringer 1x (RB):

- Cloruro sódico (NaCl).....7,00g
- Cloruro potásico (KCl).....0,42g
- Cloruro cálcico (CaCl₂).....0,24g
- Agua destilada.....1,00l
- pH = 7,2

Solución fijadora Carnoy:

- Alcohol 100º.....60%
- Cloroformo.....30%
- Ácido acético.....10%

Buffer borato:

- Ácido bórico (H₃BO₃)1,24g
- Agua destilada.....200ml
- Hidróxido sódico (NaOH) hasta pH=8,5

Buffer Tris:

- Tris(hidroximetil)aminometano ((HOCH₂)₃CNH₂).....0,605g
- Cloruro sódico (NaCl)8g
- Agua destilada.....1l
- Ácido clorhídrico (HCl) hasta pH = 7,3

Metodología

Visualización y recuento de células en división mediante marcaje con bromodeoxiuridina (BrdU).

El objetivo de este experimento era detectar y cuantificar células BrdU⁺ no vasculares en la zona periventricular y en la posible ruta migratoria hacia el giro dentado del hipocampo.

Para realizar este ensayo, utilizamos ratones tratados con BrdU tal y como se expone en el apartado de técnicas. Llevamos a cabo dos experimentos paralelos, uno sacrificando a los animales tres días después de la última dosis; y otro sacrificándolos siete días después de la última dosis.

Los cerebros extraídos fueron fijados, incluidos en parafina y cortados. Posteriormente, seleccionamos las secciones de hipocampo, y con ellas realizamos una inmunohistoquímica BrdU/hematoxilina para identificar aquellas células que se habían replicado desde la primera dosis de BrdU. Todos los tratamientos se hicieron siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Examinamos los portas bajo microscopio, y de todos ellos seleccionamos 40 cortes de semicerebro para realizar el contaje. Dividimos el hipocampo y alrededores en 9 áreas de acuerdo con el esquema de la figura 8: VI, VII, CA3.1, CA3.2, CA3.3, hilus, GD_i, GD_s y vértice. Tomamos una imagen de cada uno de los campos en cada uno de las 40 secciones seleccionadas, utilizando el objetivo 20x. Con estas imágenes realizamos el contaje de aquellas marcadas con BrdU, siguiendo el criterio de exclusión de células vasculares comentado en el apartado anterior (fig. 7).

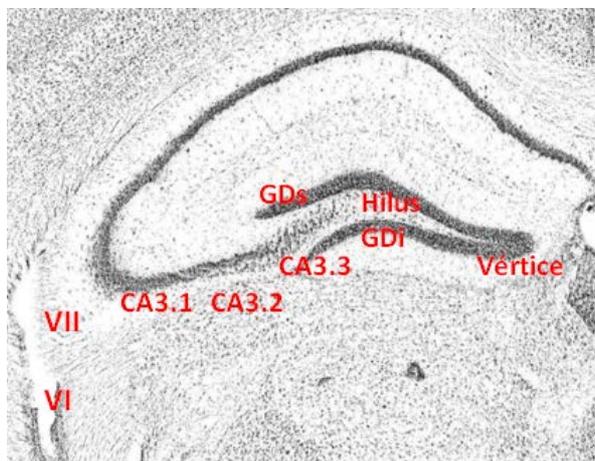


Figura 8. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Franklin & Paxinos (plate 47).* Sección de cerebro de ratón donde se muestra el hipocampo y las 9 partes seleccionadas. V: ventrículo; GD_i: giro dentado inferior; GD_s: giro dentado superior. Los subcampos han sido seleccionados para cubrir de forma diferenciada no solo el área periventricular, sino también la posible ruta de migración por debajo de CA3, el hilus y las zonas subgranular y granular del giro dentado.

Con los datos obtenidos realizamos un gráfico de medias para comparar la cantidad de células en las distintas áreas estudiadas.

Fue tras observar los resultados y en vista de que el factor tiempo podría determinar la distancia de migración, cuando decidimos realizar de nuevo el experimento, esta vez, esperando siete días para el sacrificio, en lugar de tres.

Por último, realizamos una comparación entre los resultados de ambos grupos para comprobar si había diferencias significativas entre ambos.

Detección y seguimiento de neuroblastos migratorios y neuronas diferenciadas.

La detección y seguimiento de neuroblastos migratorios se realizó mediante estudios inmunohistoquímicos en los cuales se marcó doblecortina y BrdU. De esta manera, la colocalización de ambos marcadores determina las células que se han replicado desde el momento en que se administró la primera dosis de BrdU, que están migrando y que están determinadas para diferenciarse hacia una estirpe neuronal.

El objetivo era la búsqueda de una posible ruta migratoria desde el supuesto nicho periventricular de células madre neurales hasta el hipocampo.

La detección de neuronas se realizó mediante estudios inmunohistoquímicos en los cuales se marcó β -III tubulina y BrdU. De esta forma, la colocalización de ambos marcadores determina las nuevas neuronas formadas a partir de la primera dosis de BrdU.

El objetivo era la demostración de la formación de nuevas neuronas a partir de células madre periventriculares (BrdU⁺), así como la determinación de su localización en el hipocampo del cerebro adulto.

Ambos experimentos se realizaron siguiendo los protocolos anteriormente descritos. Además en ambos casos, la inmunohistoquímica se realizó por duplicado, tanto sobre muestras de cerebro de ratones sacrificados tras tres días desde la última dosis, como sobre muestras de ratones sacrificados tras siete días desde la última dosis.

Los resultados de los inmunomarcajes fueron visualizados mediante microscopía láser confocal.

Resultados

Existen células BrdU⁺ en el entorno de la prolongación inferior del ventrículo lateral y en la parte inferior de CA3.

Como se explica en el apartado de *Materiales y métodos*, se realizó un conteo de células BrdU⁺ en distintas zonas del hipocampo para comprobar dónde había mayor cantidad de células replicándose.

La BrdU se incorpora en las células en fase de replicación. En el Sistema Nervioso adulto, las células BrdU⁺ serán aquellas que se han dividido y que corresponden con células madre neurales (exceptuando las células sanguíneas y perivasculares). De esta forma, tratamos de demostrar la existencia de áreas periventriculares asociadas al nicho neurogénico del giro dentado del hipocampo. Para el estudio de dichas áreas hemos dividido la posible ruta de migración desde el ventrículo lateral hasta el giro dentado vía CA3 e hilus en una serie de campos definidos (fig. 9) en los que hemos procedido al conteo de células BrdU⁺.

A continuación se muestra el resultado de la inmunohistoquímica BrdU/hematoxilina en el hipocampo de ratón adulto (fig. 9).

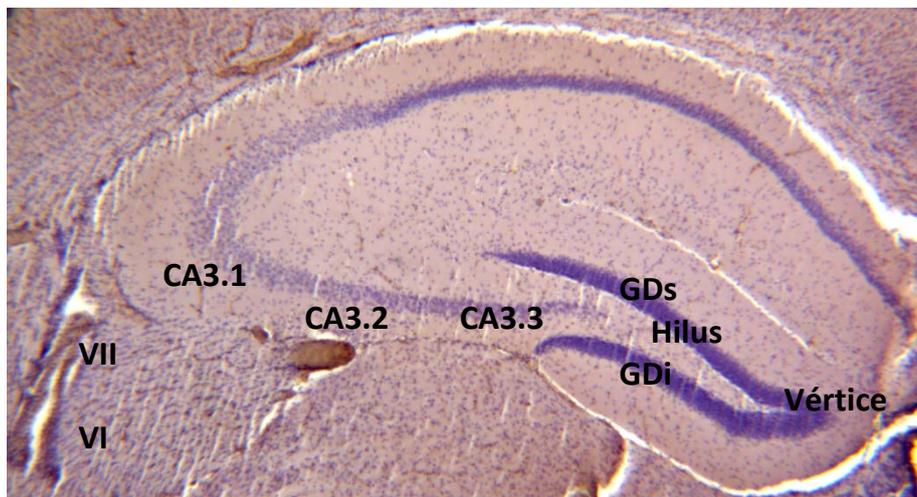


Figura 9. Hipocampo de ratón adulto (BrdU/hematoxilina). Objetivo 2,5x. Aparecen en rojo las zonas a estudiar: VI y VII (ventrículo); CA3 dividido en tres partes; hilus; GDS (giro dentado superior); GDI (giro dentado inferior); y vértice.

a) Encontramos células BrdU⁺ fuera del giro dentado, particularmente en torno al área periventricular.

Comprobamos la existencia de un número significativo de células BrdU⁺ en prácticamente todos los campos estudiados confirmando la existencia de un proceso de replicación celular asociado a precursores neurales en la zona periventricular, que puede corresponder con el área replicativa del nicho del giro dentado.

Curiosamente observamos una disminución del número de células BrdU⁺ a medida que nos acercábamos al hipocampo, siendo casi nulo en el vértice (fig. 10).

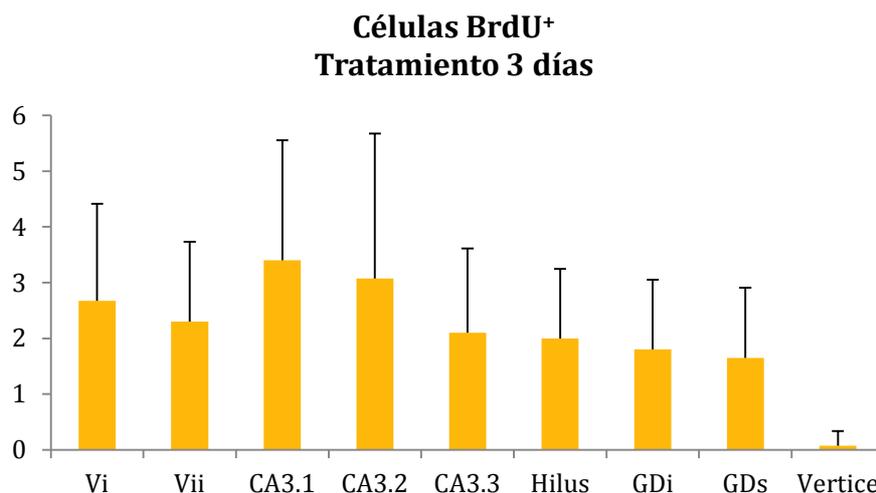


Figura 10. Representación en barras de la media obtenida tras el recuento realizado en secciones de hipocampo de ratones sacrificados tras 3 días del tratamiento con BrdU.

En vista de los resultados anteriores y con objeto de comprobar si el comportamiento dinámico de las células BrdU⁺ se modifica con el tiempo, decidimos realizar un segundo experimento esperando 7 días para el sacrificio del animal, en lugar de 3. En este segundo experimento, los ratones estuvieron expuestos 216 horas a BrdU, mientras que en el primero sólo estuvieron expuestos 120 horas.

La finalidad era comprobar si el resultado obtenido se debía al corto periodo de exposición a BrdU, de manera que las nuevas células no disponían de suficiente tiempo para llegar al hipocampo; o si, por el contrario, esa era la dinámica habitual. En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos de este segundo experimento.

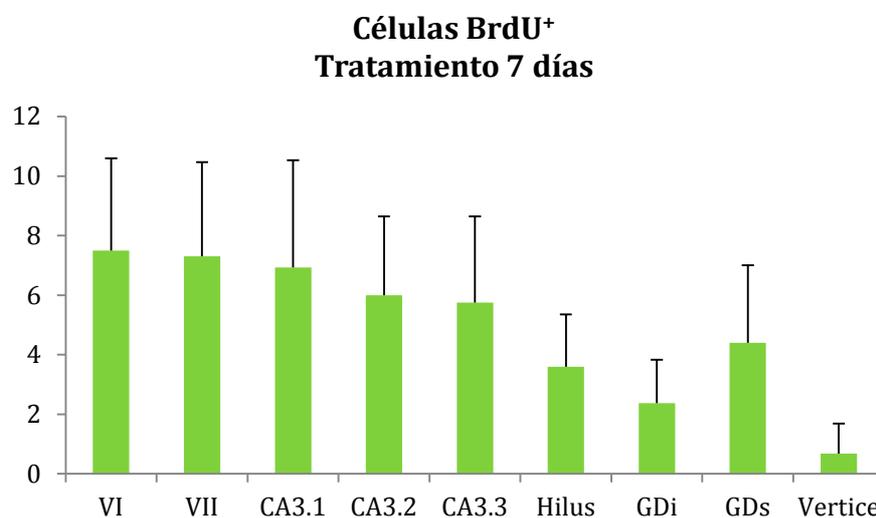


Figura 11. Representación en barras de la media obtenida tras el recuento realizado en secciones de hipocampo de ratones sacrificados tras 7 días del tratamiento con BrdU.

Tras realizar este segundo experimento, lo primero que observamos fue que el número de células en cualquier localización se incrementa con respecto al gráfico anterior (3 días; fig. 10) sugiriendo que la replicación y migración de precursores neurales en esta zona es un proceso constante. Además, se mantiene el gradiente decreciente en número de células BrdU⁺ desde el ventrículo hasta el giro dentado, es decir, a medida que nos acercamos al hipocampo el número de células BrdU⁺ disminuye.

Una posible explicación a este fenómeno, es la incorporación de las células en el giro dentado

repartiéndose entre la parte superior y la parte inferior, de esta forma el número de células BrdU⁺ en GDs y GD_i se vería disminuido. Por otra parte, es posible que el periodo de exposición a BrdU sea demasiado corto, de forma que las células que se replican no disponen del tiempo suficiente para llegar al giro dentado.

Los datos obtenidos tras el recuento se presentan en el apartado ANEXO (tabla 1 y tabla 2).

b) Encontramos células BrdU⁺ en la supuesta vía de migración desde la zona periventricular hasta el giro dentado del hipocampo.

En los resultados del recuento, tanto para el primer experimento (fig. 10) como para el segundo (fig. 11), observamos como el número de células BrdU⁺ en las tres áreas de CA3 era relativamente alto. La presencia de abundantes células BrdU⁺ no vasculares en toda la región de CA3 y del hilus sugiere que hay un tránsito de células que, o bien están en proceso de replicación, o bien lo han sufrido recientemente y migran desde la zona periventricular hacia el giro dentado. El aspecto dinámico de este tránsito viene determinado por el hecho de que existen más células positivas en CA3.1 y CA3.2 (fig. 10 y fig 11).

c) La formación de nuevas células neurales es un proceso lento.

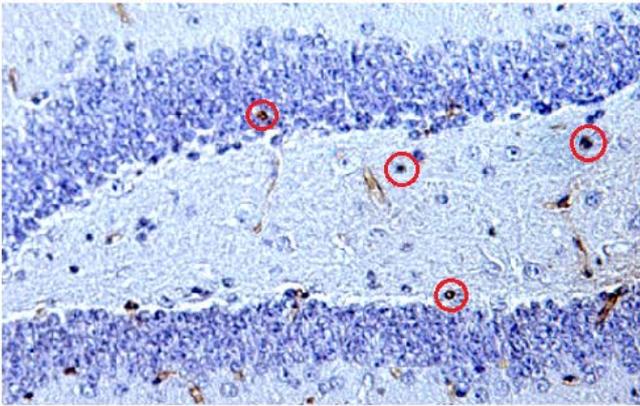
Observamos que en las muestras del segundo experimento había mayor cantidad de células BrdU⁺ (fig. 12A y 12B). Para cerciorarnos de que el número de células realmente se incrementaba, realizamos un análisis estadístico comparando cada par de muestras (fig. 12C) y obtuvimos que, excepto en el caso del giro dentado inferior, la diferencia en el número de células era estadísticamente significativa.

Además pudimos comprobar cómo, tras esperar 7 días en lugar de 3, llegaban más células BrdU⁺ al giro dentado, y su localización se repartía entre las capas subgranular y granular (fig. 13A y fig. 13B). La presencia de células marcadas dentro del propio giro dentado, tanto en la capa subgranular como granular, sugiere que todas estas células podrían formar parte de una estructura (nicho) común y seguir todo el proceso de replicación-migración-diferenciación integrándose finalmente en los circuitos hipocampales.

Los resultados de la inmunohistoquímica de fluorescencia para BrdU corroboran los datos obtenidos con la tinción BrdU/hematoxilina, en las muestras obtenidas después de 7 días de la última dosis hay mayor número de células BrdU⁺, además estas llegan a capas más profundas del giro dentado.

En su conjunto, estos resultados sugieren que estamos ante un proceso de replicación dinámico pero lento, ya que de nuestros resultados se advierte que para observar el ciclo completo desde el ventrículo hasta la capa granular es necesario esperar varios días. Además más tiempo de exposición a BrdU se traduce en incremento de células positivas.

A) Hilus BrdU/hematoxilina (3 días)



B) Hilus BrdU/hematoxilina (7 días)

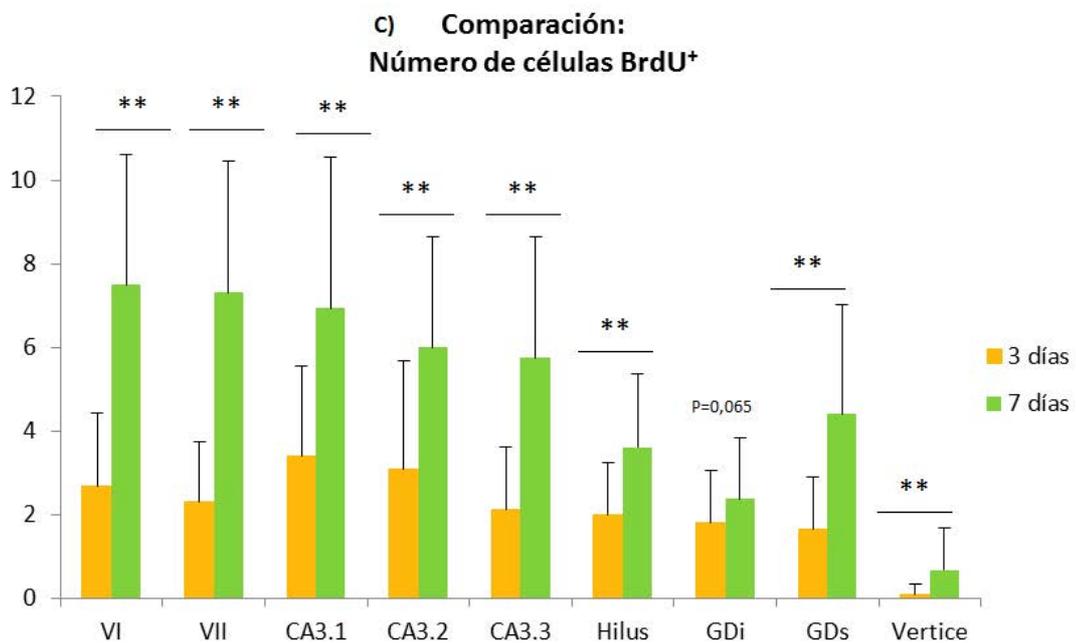
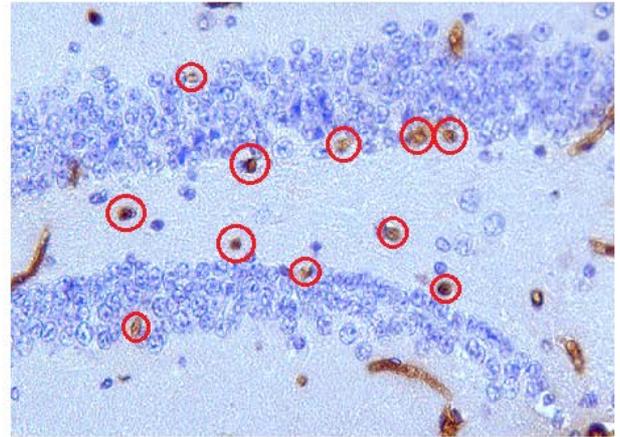


Figura 12. Comparación entre el número de células obtenidas en el primer experimento (3días) y el número de células obtenidas en el segundo experimento (7días). **A)** Inmunohistoquímica BrdU/hematoxilina en un corte de 8µm de cerebro de ratón adulto a nivel de hipocampo (objetivo 20x) sacrificado tras 3 días de la última dosis de BrdU. **B)** Inmunohistoquímica BrdU/hematoxilina en un corte de 8µm de cerebro de ratón adulto a nivel de hipocampo (objetivo 20x) sacrificado tras 7 días de la última dosis de BrdU. **C)** Comparación de los resultados obtenidos tras el recuento. Valores comparados con la prueba-t para comparar las medias de las dos muestras (*: p<0,05; **: p<0,02).

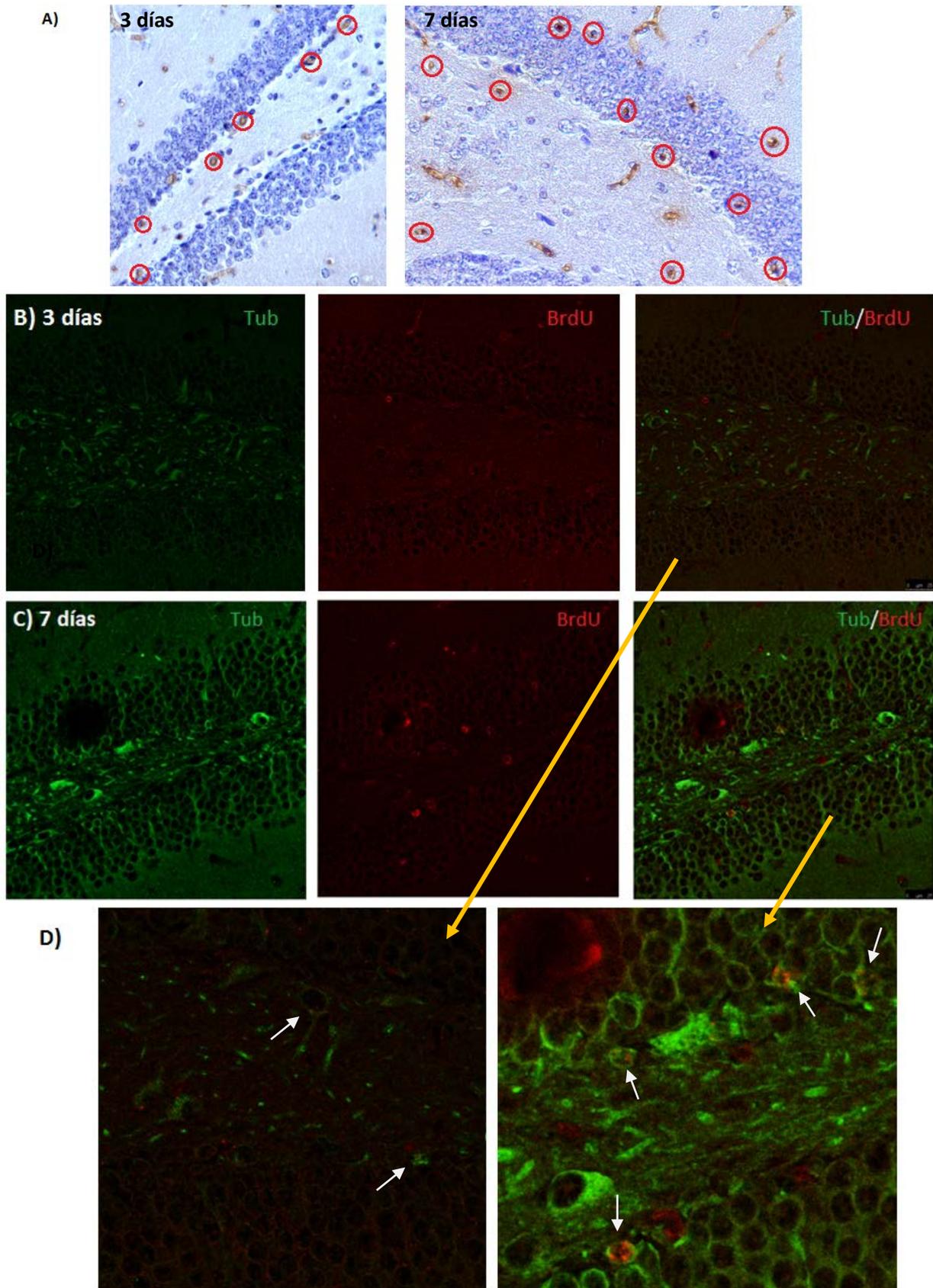


Figura 13. Comparación entre la cantidad de células que llegan al giro dentado. **A)** Hipocampo de ratón adulto (BrdU/hematoxilina) (20x). A la izquierda se muestra el resultado para ratones sacrificados tras tres días de la última dosis. A la derecha, tras siete días de la última dosis. **B)** Hipocampo de ratón adulto sacrificado tras 3 días de la última dosis de BrdU. Tinción: tubulina (verde)/brdU (rojo). Imágenes

tomadas con microscopía confocal (40x). **C)** Hipocampo de ratón adulto sacrificado tras 7 días de la última dosis de BrdU. Tinción: tubulina (verde)/brdU (rojo). Imágenes tomadas con microscopía confocal (40x). **D)** Ampliación de las imágenes superpuestas. Marcadas con flechas blancas aparecen algunas de las células $tub^+/BrdU^+$.

Las células que se replican sufren un proceso de migración y diferenciación neurogénica.

a) Hay una gran cantidad de precursores migratorios en torno a la zona periventricular.

Para estudiar la migración celular utilizamos doblecortina. La doblecortina es una proteína expresada por células neuronales postmitóticas durante el periodo de migración^[15]. De esta forma tratamos de demostrar que las células replicativas de la zona periventricular sufren un proceso de migración.

Tras realizar la inmunohistoquímica, encontramos gran cantidad de neuroblastos migratorios próximos al ventrículo. Muchas de estas células coexpresaban doblecortina y BrdU, es decir, se han dividido durante el periodo de exposición a BrdU (fig. 14A).

Sin embargo, al alcanzar CA3 el número de células $doblecortina^+$ disminuye y aparecen algunas células $BrdU^+/doblecortina^-$ (fig. 14B).

A la altura del hilus, unas pocas células doble positivas ($doblecortina^+/BrdU^+$) aparecen en el interior e incorporándose al giro dentado (fig. 14C y 14D). Además observamos la presencia de células $doblecortina^+$ en el giro dentado, suponemos que estas células continúan migrando hacia capas más internas del giro dentado.

Una explicación a las células $doblecortina^+/BrdU^-$ es que estas se hayan replicado antes de aplicar la primera dosis de BrdU en cuyo caso sería imposible la incorporación. Esto concuerda con el supuesto anterior de que se trata de un proceso lento.

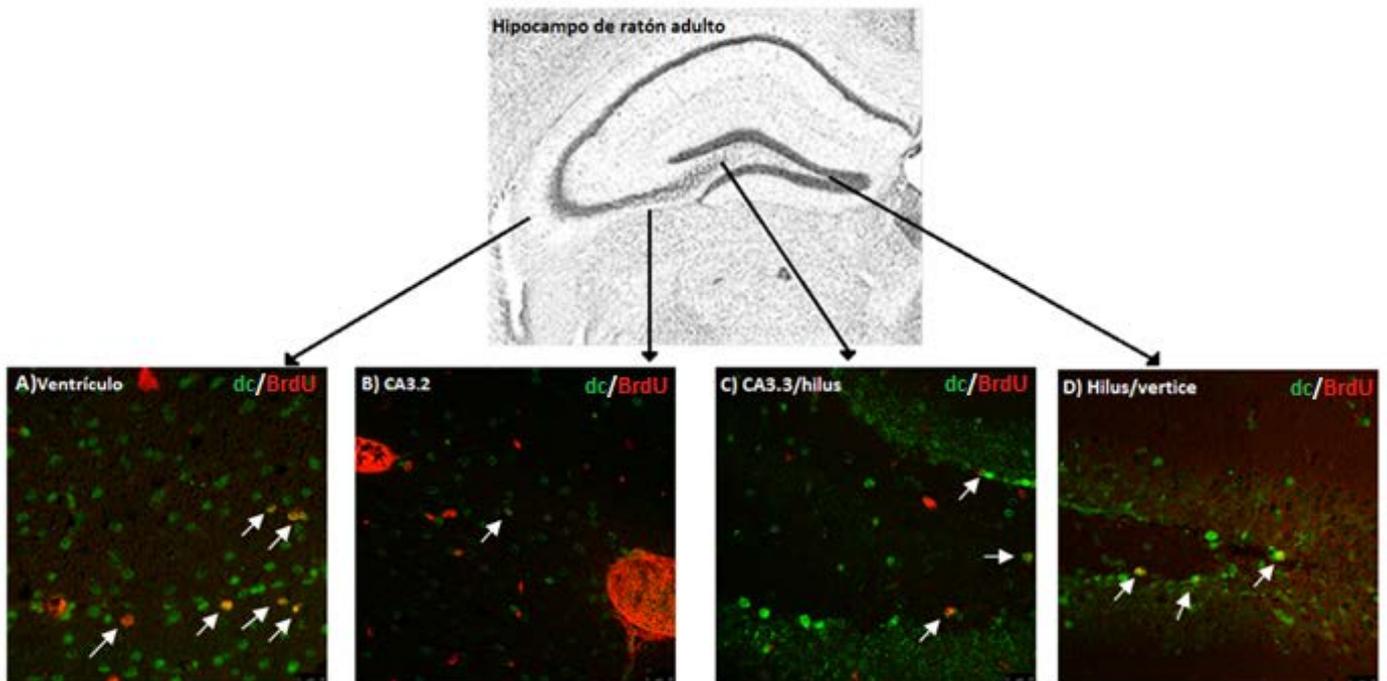


Figura 14. Imágenes obtenidas por microscopía confocal (objetivo 40x). Inmunohistoquímica **doblecortina (verde)/BrdU (rojo)**. Aparecen marcadas con flechas blancas las células positivas para ambos marcadores. **A)** Ventriculo lateral. **B)** CA3.2. Destacan mucho los vasos sanguíneos. **C)** CA3.3/Hilus. Esta imagen está tomada en la base o comienzo del hilus, se pueden ver células llegando al giro dentado. **D)** Hilus/vértice. Corresponde a la parte final del hilus, se puede apreciar el vértice.

La intensidad y el número de células BrdU⁺ que coexpresan doblecortina, es decir, neuroblastos con capacidad migratoria, es decreciente en desde el ventrículo hasta el giro dentado. Este hecho podría indicar una disminución progresiva de la capacidad migratoria según se acercan a su destino aunque también puede ser reflejo del comportamiento de las células mostrado en las gráficas (fig. 12)

b) Las nuevas células sufren un proceso de diferenciación neuronal tras su llegada al hilus.

Para comprobar que las células que incorporaban BrdU se diferenciaban a neuronas, y no a otras células neurales como astrocitos u oligodendrocitos, utilizamos el marcador β III-tubulina. Tras realizar la inmunohistoquímica, comprobamos que en los alrededores del ventrículo y CA3 muy pocas células coexpresaban ambos marcadores: β III-tubulina y BrdU (fig. 15A y 15B). No obstante, si encontrábamos coexpresión en células que parece que se están incorporando al giro dentado (fig. 13B, C y D y fig. 15C). Ocasionalmente, encontramos células tub⁺/BrdU⁺ migrando desde la zona subgranular a la granular del giro dentado.

Este resultado corrobora la formación de nuevas neuronas en el hipocampo de ratón adulto. Además pone de manifiesto la posibilidad de que las nuevas células neurales (BrdU⁺) migren desde el nicho neurogénico, situado en la zona periventricular, hasta el hipocampo, y sea una vez allí cuando se diferencien a neuronas.

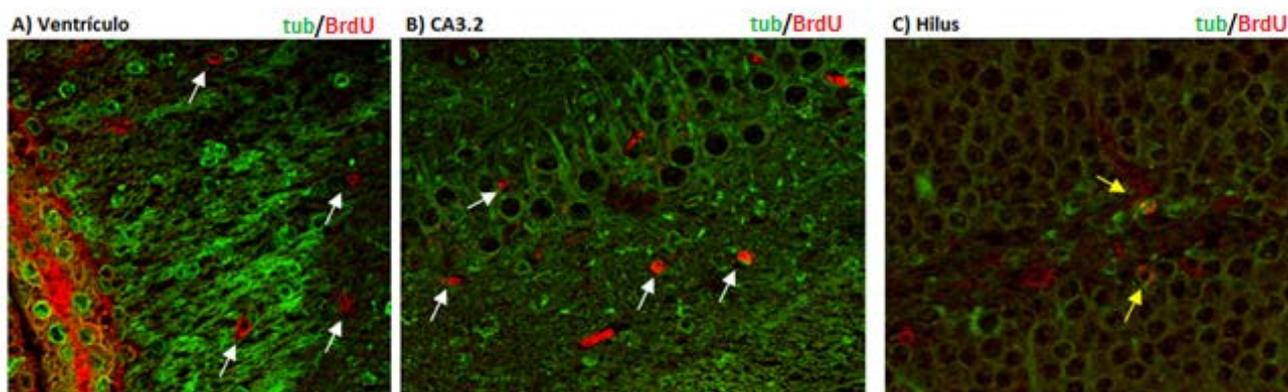


Figura 15. Imágenes obtenidas por microscopía confocal (objetivo 40x). Inmunohistoquímica β III-tubulina (verde) /BrdU (rojo). Aparecen marcadas con flechas blancas las células que sólo expresan BrdU. Las flechas amarillas señalan las células que coexpresan ambos marcadores.

c) En el giro dentado conviven células doblecortina⁺ y células β III-tubulina⁺.

Al comparar ambos marcajes, doblecortina y β III-tubulina, encontramos que ambos aparecen el giro dentado (fig. 16). Este resultado sugiere que el giro dentado está formado por neuronas y por neuroblastos migratorios que probablemente se incorporan desde el hilus a la capa subgranular y continúan la ruta hasta capas más profundas del giro dentado. En la capa granular emiten prolongaciones hacia CA3 para integrarse en los circuitos de memoria reciente [20].

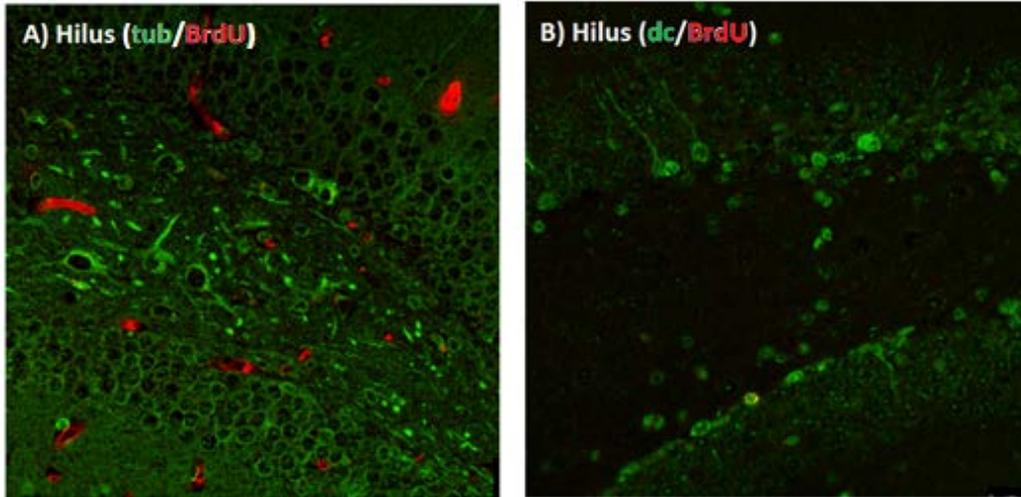


Figura 16. Comparación entre el hilus de hipocampo de ratón adulto marcado con β III-tubulina (A) y con doblecortina (B).

Observamos una posible asociación/dependencia entre las células BrdU⁺ y los vasos o el ventrículo.

Observamos una proximidad de células BrdU⁺ a los vasos sanguíneos y al ventrículo (fig. 17). Esto sugiere que las células que se han replicado, y que supuestamente están migrando, necesitan aporte de factores para mantenerse, factores que encuentran en el fluido LCR y en la sangre.

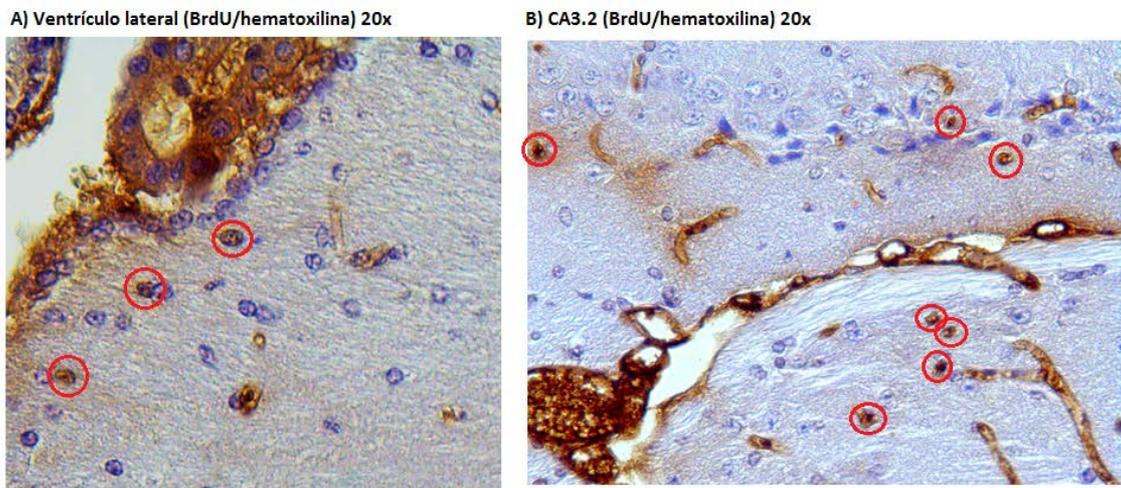


Figura 17. Imágenes del ventrículo lateral y de CA3.2 con una tinción BrdU/hematoxilina (aumento 20x). Aparecen rodeadas por círculos rojos las células BrdU⁺.

Existen células BrdU⁺ en el lado opuesto del ventrículo

Tras estudiar las fotografías obtenidas descubrimos la presencia de células BrdU⁺ en el lado opuesto del ventrículo (fig. 18). Ya que el ventrículo supone una barrera física para el paso de estas nuevas células, deben de ir a otros destinos por el momento desconocidos.

Este resultado es compatible con la existencia de un foco periventricular de células madre neurales que, además de generar células para el giro dentado, podría ser una fuente de nuevas células para otros destinos aún sin identificar.

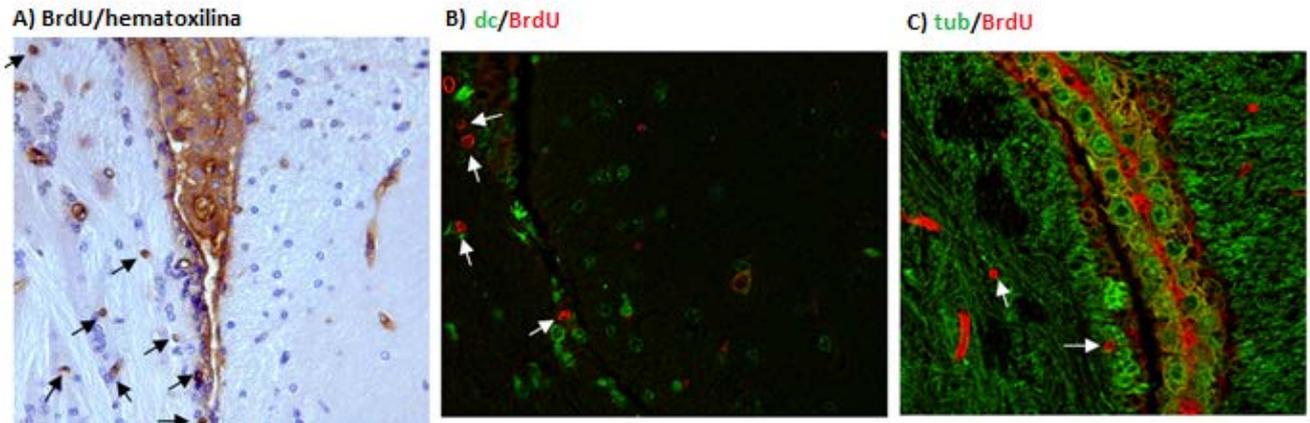


Figura 18. Imágenes del ventrículo lateral de ratón adulto, en las cuales el hipocampo se encuentra en línea recta hacia la derecha de la imagen. Las flechas marcan las células BrdU⁺.

Discusión

Las nuevas neuronas que se incorporan en el hipocampo deben proceder de un nicho neurogénico que provea a las células de las señales adecuadas para que estas sean autorrenovables, porque si no fuese así el *pool* de células madre neurales se agotaría. No obstante, hasta la fecha este nicho hipocampal es desconocido, al menos en parte, ya que, aunque está ampliamente aceptado que se encuentra en la ZSG del giro dentado, existen varios estudios que demuestran la ausencia de células con capacidad de autorrenovación en dicha zona ^[11]^[12]. Por tanto, debe existir una parte adicional del nicho en la cual las células precursoras se dividan asimétricamente de forma intensa, aportando en cada división una célula madre neural y una célula destinada a diferenciarse, cumpliendo así con el cometido de autorrenovación y expansión de la población.

Por otro lado, puesto que sólo se ha demostrado la formación de nuevas neuronas en la ZSG del giro dentado y en ZSV, es de esperar una similitud en los factores que influyen en el comportamiento de las células precursoras en ambos nichos. Sin embargo, además de la ausencia de un área de autorreplicación, encontramos una llamativa carencia en el supuesto nicho hipocampal de la ZSG con respecto a la ZSV. En esta última, las células madre neurales están en contacto directo con el LCR del ventrículo lateral, y este ejerce una gran influencia en su comportamiento. Sin embargo, en la ZSG no encontramos esta relación con el LCR. Ambas afirmaciones, junto con los datos bibliográficos comentados previamente, nos hicieron sospechar que la ZSG del giro dentado fuese sólo una parte del nicho neurogénico hipocampal, y que probablemente hubiese una zona de replicación intensa próxima al ventrículo lateral, desde donde las células migrasen hasta el hipocampo. De esta forma, proponemos un modelo semejante al de la ZSV.

En su conjunto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que existe una parte del nicho en la zona periventricular donde las células madre neurales se autorreplican y expanden su población, para después emigrar hacia el hilus, donde se integran en la capa subgranular tanto del giro dentado superior como del inferior y se diferencian en neuronas para después seguir migrando hacia las capas más profundas del giro dentado (zona granular). La ruta de migración desde las proximidades del ventrículo lateral hasta el hilus parece tener lugar por debajo de CA3. Además, las células migratorias no expresan marcadores de diferenciación neuronal ya que probablemente se encuentren en una fase pre-neuronal.

Asimismo, hemos observado una posible asociación o dependencia de las nuevas células con el ventrículo y los vasos, siendo estas más abundantes en presencia de cualquiera de los elementos. Por similitud con el modelo de la ZSV, pensamos que las células precursoras necesitan factores de replicación y supervivencia que se encuentran en el fluido intraventricular, y que serían los responsables del mantenimiento y activación de la autorreplicación. Durante la etapa de migración, los vasos sanguíneos parecen tener un papel señalizador y/o nutricional que, entre otras funciones, mantuviera el estado indiferenciado durante el proceso migratorio.

Con estos resultados proponemos un nuevo modelo basado en la existencia de una parte del nicho neurogénico hipocampal en la zona periventricular, desde el cual las células precursoras migran por debajo de CA3 hasta el hilus, donde se diferencian y se integran en el giro dentado. Este modelo tiene mucha más coherencia con el modelo de la ZSV ya que ambos están basados en un nicho periventricular, una banda de migración y un destino final donde se diferencian.

Estos datos dejan abierta una nueva línea de estudio apoyada en datos extraídos de la relación ZSV-ventrículo y la influencia del contenido intraventricular sobre la dinámica del nicho neurogénico.

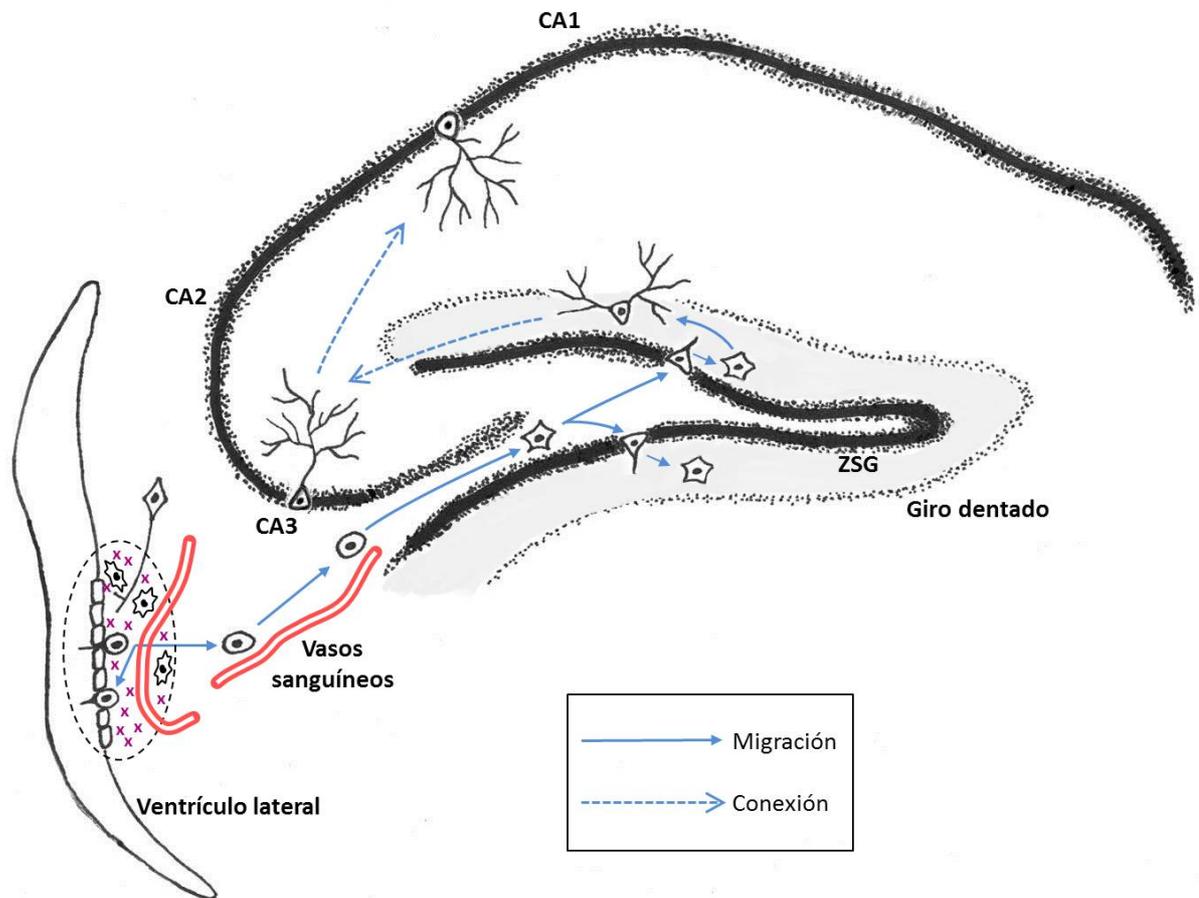


Figura 19. Representación esquemática del modelo propuesto ajustado a los resultados obtenidos.

Conclusiones

Las conclusiones obtenidas tras realizar el estudio son:

- En torno a la prolongación inferior del ventrículo lateral, existe un área de activación y replicación de células madre neurales que probablemente forma parte y complementa el nicho neurogénico del hipocampo.
- Desde este nicho parten neuroblastos migratorios neurales a través de una “banda” migratoria por debajo de CA3, que les conduce hacia el giro dentado del hipocampo.
- Una vez en el hilus, estos neuroblastos migratorios parecen integrarse en la capa subgranular del giro dentado, y por tanto, formar parte del nicho previamente descrito.
- Durante la fase de integración en la ZSG del giro dentado, parece existir un proceso de diferenciación neuronal.
- Probablemente exista una asociación/dependencia entre las nuevas células neurales y factores que se encuentran en los vasos sanguíneos y en el interior del ventrículo.
- Nuestro estudio completa el modelo del nicho del hipocampo estableciendo, al igual que en la ZSV, una zona de replicación, una banda de migración y una zona de diferenciación neurogénica con integración funcional en determinados circuitos neuronales.

Bibliografía

1. Altman, J., and Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319–335.
2. Reynolds, B. A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710.
3. Sharon A. Louis and Brent A. Reynolds. (2013). Mini-review: Neural Stem Cell. www.stemcell.com
4. Gato A., Moro JA., Alonso MI., Bueno D., De La Mano A. and Martín C. (2005). Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 284, 475-484.
5. Gato A. and Desmond ME. (2009). Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent regulators of embryonic brain growth, morphogenesis and histiogenesis. *Dev. Biol.* 15, 263-272
6. Patricio A. Riquelme, Elodie Drapeau and Fiona Doetsch. (2008). Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363, 123–137.
7. Belluzzi, O., Benedusi, M., Ackman, J., and Loturco, J. J. (2003). Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J. Neurosci.*
8. Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703–716.
9. Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y., and Gould, E. (2002). Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal dependent learning. *Hippocampus* 12, 578–584.
10. Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L. P., *et al.* (2003). Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol. Cell. Neurosci.* 23, 373–382.
11. Palmer, T. D., Willhoite, A. R., and Gage, F. H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 425, 479–494.
12. Raewyn M. Seaberg and Derek van der Kooy (2002). Adult rodent neurogenic regions: The ventricular subependyma contains neural stem cell, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J. Neurosci.* 22, 1784-1793.

13. Natalie D. Bull and Perry F. Bartlett (2005). The adult hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. *J. Neurosci.* 25, 10815-10821.
14. Kriegstein A. and Alvarez-Buylla A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 149-184.
15. Joseph G. Gleeson, Peter T. Lin, Lisa A. Flanagan and Christopher A. Walsh (1999). Doublecortin Is a Microtubule-Associated Protein and Is Expressed Widely by Migrating Neurons. *Neuron* 23, 257-271.
16. Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 1;467, 1-10.
17. Roskams AJ, Cai X, Ronnett GV (1998). Expression of neuron-specific beta-III tubulin during olfactory neurogenesis in the embryonic and adult rat. *Neuroscience* 83, 191-200.
18. Chunmei Zhao, Wei Deng and Fred H. Gage (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645-660.
19. Alvarez-Buylla and Daniel A. Lim (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41, 683-686.
20. Dan Ehninger and Gerd Kempermann (2007). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 331, 243-250.
21. Nogueira *et al.* (2014). Existence of a potential neurogenic system in the adult human brain. *Journal of Translational Medicine* 12, 75-108.
22. Alvarez-Buylla *et al.* (2014). Axonal control of the adult neural stem cell niche. *Cell Stem Cell* 14, 500-511.

ANEXO

Tabla 1. Recuento de células BrdU⁺ en ratones sacrificados tras tres días de la última dosis de BrdU.

	VI	VII	CA3-1	CA3-2	CA3-3	Hilus	GD i	GDs	Vertice
1	0	2	6	1	2	2	2	1	0
2	6	1	4	0	4	2	1	1	0
3	2	4	4	10	6	2	3	1	0
4	4	1	3	4	3	1	0	2	0
5	2	5	2	3	1	1	0	3	0
6	3	6	0	1	1	1	1	3	0
7	0	2	8	2	2	1	1	3	0
8	5	0	4	0	5	0	2	2	0
9	5	1	1	1	3	1	2	2	0
10	4	5	0	0	0	1	2	5	1
11	1	2	1	1	1	4	1	0	0
12	2	1	1	0	0	1	3	1	0
13	1	0	8	5	4	5	4	2	0
14	2	0	4	7	2	4	3	4	0
15	4	2	3	4	0	1	4	1	0
16	0	3	6	0	1	4	3	2	0
17	0	2	10	2	2	2	4	0	0
18	1	3	3	1	2	3	3	2	0
19	1	1	5	1	4	1	5	2	0
20	2	4	3	8	2	2	1	2	0
21	6	3	3	10	0	2	0	1	0
22	1	2	5	3	2	2	1	0	0
23	2	3	1	4	1	2	0	1	0
24	4	2	3	1	1	1	2	4	0
25	4	2	4	3	1	5	1	2	0
26	4	3	6	3	4	3	1	0	0
27	3	3	3	3	3	1	1	0	0
28	4	1	3	7	0	1	3	0	1
29	1	4	2	4	1	3	2	0	0
30	5	2	2	1	5	1	1	2	0
31	5	2	1	5	1	3	1	4	0
32	0	2	1	2	3	2	1	1	0
33	5	5	3	6	3	1	2	3	0
34	2	1	4	3	1	4	3	1	1
35	3	2	3	3	1	0	0	2	0
36	2	4	4	2	3	2	3	2	0
37	3	2	5	6	2	2	1	1	0
38	2	1	2	2	2	3	2	0	0
39	4	1	2	1	1	1	1	1	0
40	2	2	3	3	4	2	1	2	0

	Vi	Vii	CA3-1	CA3-2	CA3-3	Hilus	GD i	GDs	Vertice
Media	2,68	2,30	3,40	3,08	2,10	2,00	1,80	1,65	0,08
DesvEst	1,74	1,44	2,15	2,60	1,51	1,24	1,25	1,26	0,26

Tabla 2. Recuento de células BrdU+ en ratones sacrificados tras siete días de la última dosis de BrdU.

	VI	VII	CA3-1	CA3-2	CA3-3	Hilus	Gdi	GDs	Vertice
1	7	3	7	4	3	2	2	3	0
2	7	1	5	3	2	3	2	5	0
3	7	2	4	5	4	3	3	2	0
4	1	9	1	2	5	4	4	3	4
5	13	8	5	3	6	5	4	3	1
6	10	9	2	2	4	6	3	2	0
7	11	10	11	11	7	2	1	0	2
8	10	9	8	6	1	2	1	1	1
9	10	5	4	9	7	2	0	2	0
10	7	8	3	4	6	1	1	3	0
11	7	8	3	2	3	3	6	3	0
12	5	5	1	3	1	1	4	3	0
13	8	8	4	7	7	5	5	3	2
14	2	7	9	3	5	5	2	4	0
15	5	5	6	2	4	7	5	1	3
16	5	5	8	4	2	6	0	6	0
17	7	14	3	7	7	2	3	5	0
18	2	11	8	8	3	1	1	4	0
19	9	13	6	5	5	3	2	4	0
20	9	5	5	5	2	1	3	4	0
21	16	8	2	7	5	3	3	4	1
22	10	15	15	8	4	3	3	3	1
23	6	14	5	8	8	7	3	5	0
24	6	6	10	10	6	3	0	12	0
25	12	8	8	7	11	3	1	6	3
26	13	10	11	4	3	5	1	5	0
27	8	6	7	6	6	3	2	7	1
28	11	8	6	6	7	2	2	6	2
29	6	7	11	4	6	4	2	9	0
30	4	5	11	7	5	5	3	12	1
31	5	4	7	9	5	2	2	8	0
32	9	5	14	7	7	4	0	2	0
33	9	6	4	14	5	4	4	5	0
34	7	3	10	7	10	2	4	7	0
35	5	7	15	9	14	5	2	1	0
36	4	7	6	8	12	6	4	6	0
37	7	4	6	6	10	2	2	4	2
38	6	8	12	7	9	7	1	5	1
39	6	10	8	5	8	4	3	3	1
40	8	6	6	6	5	6	1	5	1

	VI	VII	CA3-1	CA3-2	CA3-3	Hilus	GDi	GDs	Vertice
Media	7,50	7,30	6,93	6,00	5,75	3,60	2,38	4,40	0,68
DesvEst	3,10	3,16	3,61	2,65	2,90	1,76	1,46	2,61	1,01