

MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Activación de la neurogénesis en médula espinal de ratón adulto por factores embrionarios

Alumna: Beatriz Gómez Vicente

Tutor: Dr. Ángel Gato Casado

Cotutora: Dra. María Isabel Alonso Revuelta

Septiembre de 2016

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	3
1. Neurogénesis en el adulto	3
2. ¿Qué sabemos en la actualidad de los nichos neurogénicos en adultos?	4
3. Canal medular, ¿Nuevo nicho neurogénico?	5
4. Nuevas terapias: Fluido cerebroespinal embrionario (CSF-e) como componente clave en el canal medular	6
II. HIPOTESIS	8
III. OBJETIVOS	8
IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	9
V. MATERIAL Y MÉTODOS	9
1. Preparación del cultivo	9
2. Soluciones empleadas	10
3. Cuidado y mantenimiento de los animales del laboratorio	11
4. Obtención de fluido cerebroespinal embrionario	11
5. Obtención de médula espinal de ratón adulto. Zona torácica	12
6. Elaboración del cultivo celular in-vitro	12
7. Inclusión en parafina	13
8. Preparación histología de las muestras	13
9. Inmunohistoquímica	14
9.1. Inmunohistoquímica anti-BrdU In toto o en bloque.	14
9.2. Inmunohistoquímica anti-BrdU en secciones histológicas de muestras incluidas en parafina	14
10. Estudio de proliferación celular. Ratones FGF2 KO frente ratones WT	15
11. Estudio de la morfología de tejido medular de ratón adulto	15
12. Tinción de secciones histológicas con hematoxilina-eosina	16
13. Contaje de células con BrdU en cortes de parafina, KO,WT, In toto	16
14. Análisis estadístico	16
VI. RESULTADOS	17
1. Primera Etapa de experimentación: Cultivo organotípico	17
1.1. Análisis de la proliferación celular en secciones medulares de 300 µm de espesor mediante inmunohistoquímica In-toto para células BrdU positivas	18
1.2. Análisis de la proliferación celular en cortes transversales de 8 µm de espesor de secciones medulares incluidas en parafina, mediante inmunohistoquímica anti-BrdU	20
2. Segunda Etapa de experimentación: Análisis de la actividad de replicación en médula de ratón KO para FGF2	22
2.1. Análisis de la proliferación celular en cortes transversales de 8 µm de espesor de secciones medulares incluidas en parafina de KO y WT, mediante inmunohistoquímica anti-BrdU	23
VII. DISCUSIÓN	26
VIII. CONCLUSIONES	27
IX. BIBLIOGRAFÍA	28
ANEXO I: ABREVIATURAS	30

I. INTRODUCCIÓN

1. Neurogénesis en el adulto

El sistema más complejo que poseen los mamíferos es el Sistema Nervioso (SN), capaz de regular y coordinar la actividad para establecer una interacción con el entorno.

El SN esta compuesto por neuronas y células glia (oligodendrocitos, astrocitos y microglia). La principal actividad del Sistema Nervioso la ejercen las neuronas, cuya función principal es la de recepción, organización y transmisión de señales mediante potenciales de acción. A su vez, esta función es favorecida por las células gliales, encargándose de aportar un aislamiento, una protección y un mantenimiento homeostático de todo el sistema. Por lo que tienen una participación activa en la modulación y transmisión de las señales nerviosas.

Existen numerosas evidencias de que cualquier alteración en la función de las células gliales pueden contribuir al desarrollo, e incluso provocar, enfermedades del SNC, especialmente en las enfermedades neurodegenerativas.

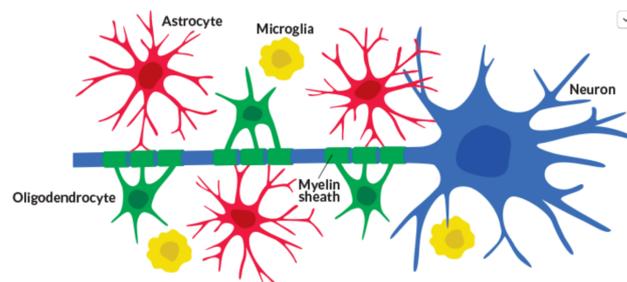


Figura 1: Neurona y Células gliales. Oligodendrocitos (verde), astrocitos (rojo), microglia (amarillo) pueden influir en el aprendizaje y la memoria, ayudando a las neuronas a mantener el flujo de señales eléctricas y químicas entre ellas. (Yeager, A. 2015)

Tanto las células neuronales, como las células glia, van a tener un proceso de diferenciación complejo, conocido como neurogénesis. Definido como el proceso de formación de nuevas neuronas a partir de células madre o precursores neurales.

Hasta hace relativamente poco, este proceso se pensaba que ocurría tan solo en el desarrollo embrionario y post natal, sin ninguna capacidad de regeneración en edad adulta.

Pero un hecho inesperado ocurrió en neurobiología hace 20 años cuando se descubrió en adultos la existencia de un depósito de células madre no diferenciadas que caracteriza el cerebro de los vertebrados, cuya función es apoyar la génesis celular en varios tejidos y órganos, jugando un papel esencial en la sustitución de células diferenciadas que se disipan debido a la pérdida fisiológica, lesión o enfermedad. (Deleyrolle & Reynolds, 2009), (Peretto & Paredes, 2014)

En la década de los 60, Josef Altman fue quien primero relato las primeras evidencias de formación de nuevas neuronas en el cerebro de roedores adultos, utilizando la técnica de autorradiografía con timidina tritiada (timidina-3H), aunque esta idea fue descartada en los años siguientes. (Altman & Das, 1965)

En la década de los noventa del pasado siglo, diversos grupos realizaron las investigaciones con las que se demostró que la neurogénesis persiste en mamíferos superiores como primates y humanos adultos. En 1992, Reynolds y Weiss, emplearon un sistema de cultivo libre de suero para detectar las células precursoras en el cerebro adulto. Una pequeña población de células se mantuvieron en un estado indiferenciado y proliferado hasta formar racimos, llamados neuroesferas. Estas neuroesferas pueden ser disociadas para formar numerosas esferas secundarias (indiferenciadas) o diferenciarse en neuronas y astrocitos. (Reynolds & Weiss, 1992)

La neurogénesis, por tanto, en los adultos, se puede definir como el proceso de formación de nuevas neuronas funcionales a partir de células madre o precursores neuronales ocurriendo tales hechos en regiones restringidas del cerebro de los mamíferos. A lo largo de las últimas décadas se han realizado numerosos esfuerzos de investigación en este campo que han proporcionado información significativa con respecto a los mecanismos anatómicos, moleculares y funcionales subyacentes a la existencia de neurogénesis en el cerebro adulto. La nueva producción de neuronas del cerebro adulto interviene en la regulación de las funciones integradas, el aprendizaje y la memoria, adaptando nuestro cerebro a un mundo cambiante. (Peretto & Paredes, 2014)

Actualmente, está claro, que en determinadas condiciones fisiológicas, la capacidad de generar y reponer la pérdida neuronal ocurre en localizadas áreas cerebrales como son la zona subventricular-bulbo olfatorio (ZSV), relacionado con la memoria olfativa y el giro dentado del hipocampo (ZSG), implicado en procesos de aprendizaje/memoria. (Lois & Alvarez-Buylla, 1994) (Kempermann, Wiskott, & Gage, 2004)

El proceso neurogénico en estas regiones está orquestada por una compleja interacción entre señales ambientales intrínsecas y extrínsecas. Varias señales de desarrollo, morfógenos, factores de crecimiento, neurotransmisores, hormonas, factores de transcripción, y reguladores epigenéticos, se han descrito para regular ya sea, positiva o negativamente, la actividad y la especificidad de las células progenitoras en proliferación, así como la migración y la integración de los precursores neuronales dentro de los circuitos funcionales. (Faigle & Song, 2013) (Hagg, 2016)

2. ¿Qué sabemos en la actualidad de los nichos neurogénicos en adultos?

Las áreas del cerebro capaces de producir nuevas neuronas en los adultos se conocen como regiones neurogénicas. Como ya mencionamos anteriormente, en el cerebro adulto de mamíferos hay dos regiones neurogénicas claramente definidas: La Zona Subventricular situada en los ventrículos laterales y la Zona Subventricular del giro dentado del hipocampo.

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

La capacidad neurogénica de estas dos regiones es limitada y decrece con la edad. Aunque se trate de un proceso continuo a lo largo de la vida, el periodo donde más actividad presenta es durante el desarrollo, decayendo a lo largo de los años de vida del individuo. (Arias-Carrión&Olivares-Buñuelos, 2007)

Se han descubierto células con potencial proliferativo en otras regiones del SNC, como el tercer ventrículo, el canal ependimario de la médula espinal (ME) o la corteza cerebral, conociendo poco sobre la actividad neurogénica en estas regiones y su implicación en el funcionamiento del Sistema Nervioso. (García Verdugo&Gil-Perotín, 2014)

En base a lo expuesto anteriormente, surgió la idea principal de este trabajo.

3. Canal medular, ¿Nuevo nicho neurogénico?

En la médula espinal adulta, al igual que en el cerebro, se han identificado precursores neuronales.

En el año 1996, Weiss y colaboradores cultivaron tres zonas diferentes de tejido medular (cervical, torácica y lumbar) y en todas, se logró la formación de neuroesferas, comprobándose que estas células mantienen su potencial de diferenciación. (Weiss et al., 1996).

Sin embargo, a diferencia del cerebro, en la médula espinal adulta el número de células madre es más reducido y no existe una capa subependimaria definida que las contenga.

En el cerebro, los precursores neuronales, células con carácter astrocitario dan origen a nuevas neuronas y actúan como células madre neuronales en la ZSV y en el ZSG. (Pastrana, Cheng, & Doetsch, 2009)

Como posibles precursores neuronales medulares en adultos se sugirió que podrían existir tres tipos celulares diferentes: Progenitores de oligodendrocitos, Células ependimarias y Astrocitos. El grupo de Barnabé evaluó el papel de las tres principales poblaciones de células neuronales que proliferan en la médula espinal sana y lesionada durante la renovación celular.(Barnabé-Heider F. et al., 2010)

En una médula no lesionada, los astrocitos y las células ependimarias proliferan para mantener la población mientras los progenitores de oligodendrocitos se autorenewan y generan más oligodendrocitos maduros. Tras una lesión medular las células ependimarias aumentan y se diferencian y, de hecho, constituyen la principal población celular en la médula espinal intacta con propiedades in vitro de células madre neurales, pero el origen del incremento de células madre neurales que se produce tras la lesión es desconocido. Este incremento, se ha comprobado mediante cultivo de células ependimarias de animales con y sin lesión tras una semana de la misma y se observó que la proliferación in vitro fue 10 veces mayor en los cultivos de animales lesionados que de animales sin lesión, junto con un incremento de células apoptóticas en el grupo sin lesión.(Moreno-Manzano et al., 2009)(Bisbal Velasco, V. 2015).

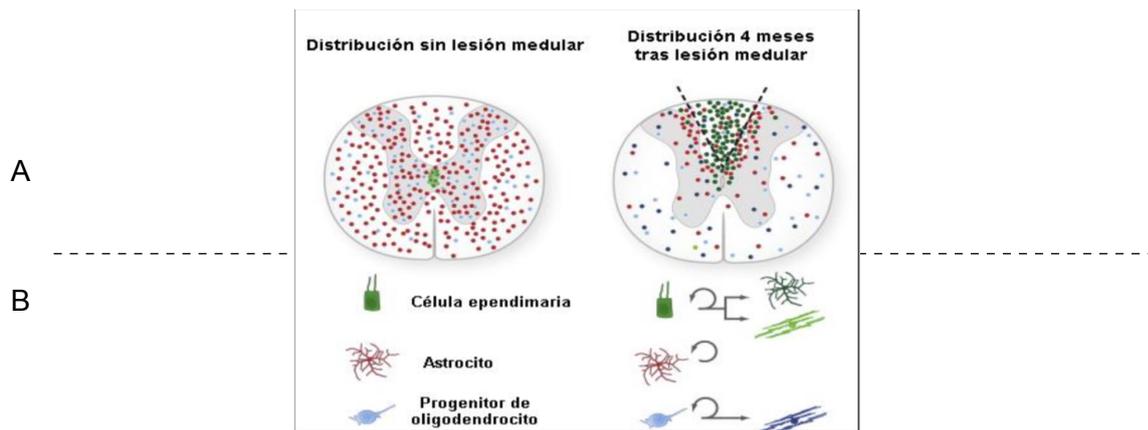


Fig 2. La contribución relativa de las células endimarias, astrocitos, progenitores de oligodendrocitos en el adulto de la médula espinal. (A) La distribución de las células endimarias (verde), astrocitos (rojo), y los progenitores de oligodendrocitos (azul); (B) Representación esquemática de la suerte de la proliferación de células endimarias, astrocitos y oligodendrocitos progenitores en la médula espinal intacta y herida. (Barnabé-Heider et al., 2010)

A su vez, las células madre endimarias son capaces de migrar a la zona de la lesión. (figura 2, representa de forma más esquemática las células endimarias (en verde), los oligodendrocitos inmaduros del parénquima, (en azul) que proliferan abundantemente y migran hacia la zona afectada por la lesión.) Evidenciándose la existencia de un incremento de la capacidad de regeneración endógena tras lesión medular frente a condiciones fisiológicas. Esta estrategia de regeneración, funciona eficientemente en los vertebrados inferiores, como ocurre en los anfibios y reptiles que regeneran espontáneamente la función neuronal tras una lesión medular por intervención de las células endimarias residentes. (Zhou et al., 2013).

Dado que la capacidad de neurogénesis en mamíferos en edad adulta es insuficiente en la regeneración del tejido nervioso dañado tras una lesión medular, es necesario desarrollar terapias adicionales que contribuyan a la regeneración del tejido.

Aunque el reclutamiento selectivo de células madre endógenas en el SNC adulto queda por demostrar, hay datos que sugieren que las células endógenas son susceptibles a la modulación por infusión intraventricular de factores de crecimiento. Además, la identificación de moléculas que dirigen la diferenciación de la progenie de células madre adultas a lo largo de linajes específicos puede permitir la inducción de neurogénesis en la médula espinal del adulto. (Shihabuddin et al., 2000)

4. Nuevas terapias: Fluido cerebroespinal embrionario (CSF-e) como componente clave en el canal medular.

El sistema nervioso se desarrolla a partir de las células neuroepiteliales, que constituyen la pared del tubo neural del embrión en el desarrollo. Éstas son esencialmente células pluripotentes que generaran el conjunto de precursores para todo el encéfalo y la médula espinal.

Según va avanzando su diferenciación, en el tubo neural se generará una cavidad ciega, delimitada por neuroepitelio, lleno de un fluido, conocido como Fluido Cerebroespinal Embrionario (CSF-e), rico en proteoglicanos, citoquinas (IL-1 β , IL-6), factores de crecimiento, ácido retinoico,

vitaminas, entre otros, el cual resulta indispensable para la regulación de los procesos tempranos de crecimiento. El CSF-e generará un aumento de presión que contribuirá a la expansión de vesículas cerebrales en formación, así como a la proliferación y diferenciación de las células del neuroepitelio. (Martín et al., 2006) **Figura 3.**

Este aumento de la presión hidrostática ejercida por CFS-e solo afecta de manera exclusiva al cerebro primitivo, generando cambios en la morfología y un aumento drástico del volumen en el extremo cerebral. Durante el proceso expansivo, la presión no se reduce a través de la médula espinal, ya que el tubo neural está cerrado transitoriamente entre la médula espinal y el cerebro primitivo por el empuje de los tejidos dorsales a los pliegues neurales en esa zona.

El CSF-e está presente en todas las especies, con alguna diferencia ontogenia, lo que le hace aún más llamativo, y nos conduce a conocer cuál es su composición, viendo una clara diferencia entre el CSF-e y el CSF adulto, siendo las proteínas, quienes presentan una concentración superior en el embrión que en el adulto. Estos datos han sido relacionados con el hecho de que la proliferación, supervivencia y diferenciación neuronal sea mucho mayor durante el desarrollo embrionario que en la vida adulta. (Gato & Desmond, 2009).

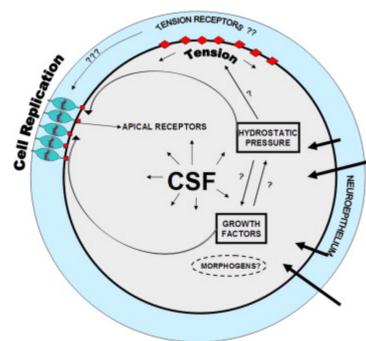


Fig 3: Esquema explica la interdependencia de las interacciones de la presión hidrostática creada por el CSF-e y los factores de crecimiento sobre el comportamiento del neuroepitelio en cerebro medio. El fluido atraviesa el neuroepitelio a través de un gradiente osmótico (flechas grandes a la derecha). El CSF-E genera la expansión de la superficie luminal (flechas radiales). Los factores de crecimiento probablemente estimulan la mitosis de las células neuroepiteliales a través de receptores apicales (cajas rojas). También puede haber una influencia mutua entre factores de crecimiento y presión hidrostática. La presión hidrostática genera tensión en la superficie interna del neuroepitelio, estimulando la actividad mitótica a través de receptores de tensión, en la superficie o dentro de las células neuroepiteliales. (Gato & Desmond, 2009).

Podemos concluir que el CSF contenido en las cavidades cerebrales (ZSV y ZSG) y dentro del canal medular (células endimales) va a ser considerado un componente esencial del nicho neurogénico. Por esta característica, no es casualidad, que los progenitores cerebrales y los progenitores endimarios estén en contacto con este fluido. (Martín et al., 2006), (Gato & Desmond, 2009), (Alonso, Martín, Carnicero, Bueno, & Gato, 2011)

Estas características llevan a pensar que este fluido pueda resultar para las células progenitoras un potente inductor que estimula su expansión y diferenciación. En concreto, existen factores mitogénicos y tróficos que se han relacionado con procesos de proliferación y diferenciación durante el desarrollo embrionario, entre los que destacan los factores de crecimiento de

fibroblastos (FGF2), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento insulínico (IGF).

Martín y colaboradores demuestran en sus ensayos como el FGF2 identificado en CSF-e ejerce un efecto positivo sobre la proliferación y neurogénesis de cultivos neuroepiteliales de embriones de mamífero. (Martín et al., 2006)

En los últimos años han surgido evidencias que sugieren que un pequeño grupo de células endimarias del canal central de la médula espinal de ratones adultos son capaces de responder a EGF y FGF2. (Kojima. A & Tartor. C, 2000)

Por extrapolación a estudios realizados en nuestro laboratorio, consideramos entre los objetivos planteados demostrar la importancia de este componente en la proliferación de células endimarias de médula espinal de ratón mutante para el FGF2.

II. HIPÓTESIS

Los procesos que tienen lugar tras la lesión medular incluyen la muerte de neuronas, oligodendrocitos, astrocitos, así como la formación de cavidades que pueden interrumpir las vías axonales ascendentes y descendentes.

A su vez, existen señales tras la lesión medular que fomentarán la recuperación espontánea tras la proliferación de nuevos precursores neurales en el canal endimario (células endimarias). Sin embargo, la reparación espontánea es incompleta y se requiere intervención terapéutica.

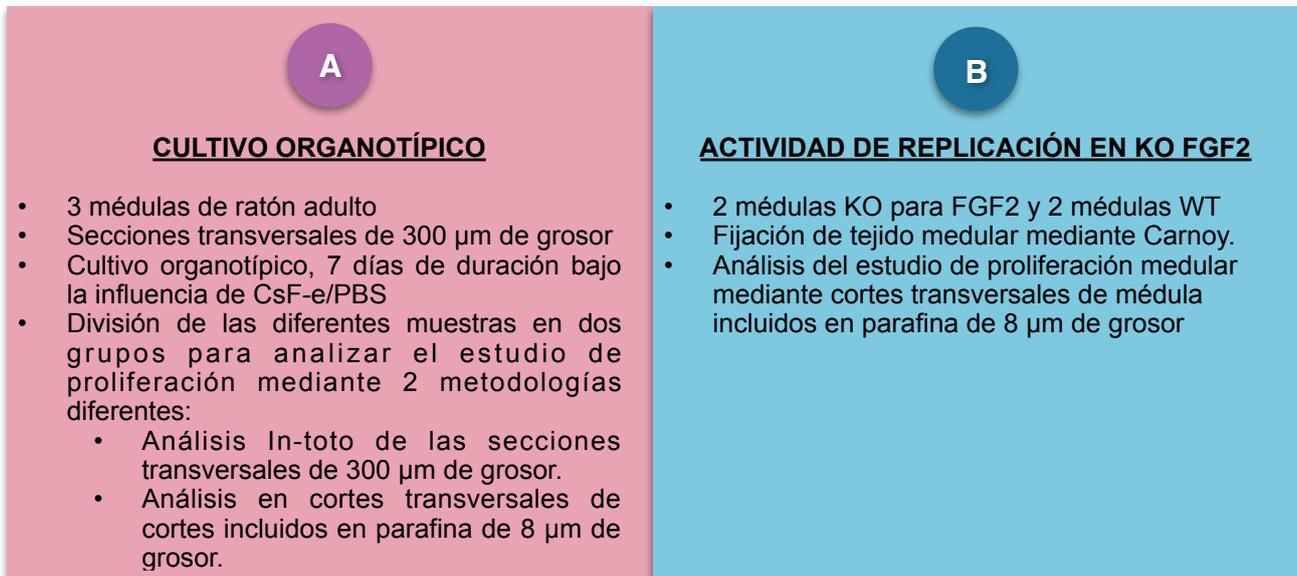
Basándonos en antecedentes de nuestro equipo, vimos la posibilidad de potenciar la proliferación de dichas células proporcionando al área de lesión un fluido rico en factores de crecimiento y mitogénicos como es el CSF-e, considerado un potente activador de precursores neurales en cerebro adulto de ratón.

Con este trabajo trataremos de valorar y cuantificar la activación de los progenitores neurales endógenos de médula espinal adulta de ratón inducido por CSF-e.

III. OBJETIVOS

- Identificar los precursores neurales en la médula espinal torácica de ratón con capacidad mitogénica.
- Mediante la realización de un cultivo organotípico y microimplante de microesferas impregnadas en CSF-e, valoraremos la influencia del mismo en la replicación y expansión de la población de precursores.
- Determinar el efecto de la ausencia del FGF2 sobre la proliferación de precursores medulares en ratones adultos.

IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



V. MATERIAL Y MÉTODOS

Para verificar si la hipótesis planteada es cierta, se propuso el siguiente diseño experimental.

En primer lugar, nuestro objetivo era obtener y cultivar *in vitro* secciones medulares de ratón mediante un sistema de cultivo organotípico.

La finalidad del cultivo es valorar la presencia de precursores neuronales a nivel medular en ratón adulto y comprobar si mediante factores embrionarios se activa una diferenciación de los mismos.

El medio de cultivo está definido y se le adiciona con microesferas de CSF-e /PBS según el procedimiento experimental (Experimentales/Controles) durante 7 días.

Para realizar el cultivo *in vitro* de secciones medulares de ratón hay que seguir una serie de pasos que se exponen a continuación:

1. Preparación del cultivo

Al trabajar con un cultivo de duración media (7 días), hemos de asegurarnos de tener unas condiciones adecuadas de esterilidad. Por lo que el uso de la campana de flujo laminar es esencial, al igual que las soluciones, medios de cultivos y material quirúrgico, deben de estar esterilizados. Se deben cumplir los requisitos de esterilidad durante todo el procedimiento.

2. Soluciones empleadas

Bacto-agar. 100ml: 3% de agarosa. Una vez disuelto, se mantiene en estado sólido a temperatura ambiente. El día que se vaya a hacer el cultivo se calienta en un baño a 55°C y mantiene la temperatura durante todo el experimento para evitar que se solidifique.

Solución Salina Isotónica. 1L:

- * Cloruro sódico (NaCl) —7,00g
- * Cloruro potásico (KCl) —0,42g
- * Cloruro cálcico (CaCl₂) —0,24g
- * Agua destilada —1 L

pH=7,2. Se conserva a 4°C.

Glucosa. 20ml: Se prepara glucosa al 25% en agua destilada. Se guarda a 4°C.

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 100ml + 6,5mg de glucosa. Se guarda a 4°C.

Medio de cultivo DMEM.50 ml. 50% Advanced DMEM, 25% Horse serum, 25% HBSS, 1% Antibiótico Penicilina +Streptomycin, 6.5mg/ml glucosa.(37°C).

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

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

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

Solución fijadora Carnoy. 100ml

- * Alcohol 100% — 60%
- * Cloroformo —30%
- * Acido acético — 10%

Buffer Borato (H₃BO₃) 0,1M. 250ml

- * Ácido bórico (H₃BO₃) —1,24g
- * Agua destilada — 250ml
- * Hidróxido sódico (NaOH) hasta pH=8,5

TBS. 1L

- * Tris(hidroximetil)aminometano ((HOCH₂)₃CNH₂)—0,605g
- * Cloruro sódico (NaCl) —8g

- * Agua destilada—1l
- * Ácido clorhídrico (HCl) hasta pH = 7,3

TTBS. 1L

- * TBS+Triton x-100 (0.025%)

Solución de H₂O₂ al 3%.

3. Cuidado y mantenimiento de los animales del laboratorio

Para el estudio se utilizan ratones adultos de la raza Swiss-webster, de dos meses de edad. Se les ha mantenido en el estabulario en condiciones óptimas de humedad y de temperatura, sometidos a ciclos alternantes de luz/oscuridad y sin estímulos estresantes. Se utilizaron machos y hembras indistintamente.

Se ha seguido el Real Decreto 53/2013 del 1 de Febrero vigente, respecto a las normas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación.

4. Obtención de fluido cerebroespinal embrionario.

Para obtener los embriones, se juntan 3 hembras jóvenes en edad fértil con un macho joven, a las 19 h para permanecer así durante toda la noche.

A las 9 h del día siguiente, se procede a separarles; comprobando si aparece tapón mucoso vaginal como signo de cópula y posible preñez. A partir de las 0 horas de ese día, se considera que ha comenzado el desarrollo embrionario.

Se mantienen separadas a las hembras preñadas hasta el 11,5 días, momento adecuado para la extracción de los embriones. A las ratonas se les aplicó anestesia profunda y duradera mediante una inyección intraperitoneal de una mezcla de Ketamina (150 mgr/Kg de peso)/Xylacina (10 mgr/Kg de peso).

Una vez que las ratonas que hayan sido anestesiadas, se les realiza una laparatomía abdominal con la finalidad de extraer quirúrgicamente el útero y aislar a los embriones de las membranas extraembrionarias y amnióticas. Posteriormente, el animal es sacrificado mediante decapitación. En un placa de petri se depositan los embriones y con un micromanipulador se inserta una micropipeta de vidrio (30 µm de diámetro interno) en la cavidad mesencefálica, se procede a la aspiración de CSF-e. Como la cantidad extraída de un solo embrión es muy poca, se elabora un pool utilizando varios embriones. Es importante evitar la contaminación del mismo por células de la pared neuroepitelial.

El CSFe se va acumulando en un eppendorf a 4°C e inmediatamente se liofiliza y se almacena a -40°C hasta su uso.

5. Obtención de médula espinal de ratón adulto. Zona torácica

- a) Se anestesia profundamente a los ratones mediante una inyección intraperitoneal de una mezcla de Ketamina (150 mgr/Kg de peso)/Xylacina (10 mgr/Kg de peso). Una vez que nos hemos asegurado que el animal está completamente anestesiado, es decapitado.
- b) Al animal se le coloca con la columna espinal hiperflexionada para acceder más fácilmente a la médula espinal en la cavidad torácica.
- c) Se pulverizó el ratón con etanol al 70% para desinfectar la zona, además al mojar el cabello del animal evitamos que se adhieran los pelos en el material quirúrgico.
- d) Con unas tijeras finas afiladas, se hace una pequeña incisión en la línea media permitiendo retirar el pelo y la piel de la parte posterior del ratón para exponer la columna vertebral cervical.
- e) Usando una cuchilla, se hace una incisión a la izquierda y a la derecha de la columna vertebral para separarla del músculo y exponer la región dorsal de la columna torácica
- f) Cuando está expuesta la columna, mediante unas micro-tijeras se cortan los arcos vertebrales y se retiran para exponer la médula espinal.
- g) Cuidadosamente se seccionan las raíces de los nervios raquídeos derechos e izquierdos y se separan los sectores torácicos,
- h) Una vez que se está seguro que la médula se ha aislado en su totalidad, se procede a levantar el tejido e introducirlo en Ringer a 4°C.



Figura 4: Exposición de la médula espinal torácica.

6. Elaboración del cultivo celular *in vitro*

- i. Para poder realizar secciones transversales el tejido es introducido en un molde que contiene una solución de agarosa al 3%, mantenida en estado líquido a 55°C en un baño caliente. y deja solidificar a 4°C durante una hora y media.
- ii. El molde de agar se talla y se fija en un vibrátomo de Leica VT1200. Obtenemos secciones seriadas de 300 µm de grosor de tejido medular. Cada sección se pasa a una placa petri con HBSS + 6,5 mg/ml de glucosa fría.
- iii. Mediante microscopio 10x se eligen las secciones idóneas para proceder a su cultivo *in vitro*.

- iv. Se depositará cada una de esas secciones sobre un filtro Millipore de 0,8µm de tamaño de poro, previamente hervido en agua destilada durante 5 minutos para eliminar sustancias que afecten al tejido medular.
- v. Cada sección se cubre con una gota (5µm aproximadamente) de colágeno preparado el mismo día del cultivo, favoreciendo la nutrición e hidratación del tejido, ya que esta modalidad de cultivo, los nutrientes son absorbidos por capilaridad.
- vi. Dependiendo del tipo experimental se implementarán en el canal medular microesferas o beads de látex de un diámetro entre 125-250 µm, previamente impregnadas con CSF-e (experimental)/PBS (control) mediante inmersión a 4°C al menos durante 24 horas previas al experimento.
- vii. Todo el conjunto se traslada a una placa de petri, a la cual se ha emplazado un anillo de teflon y una rejilla metálica. Este montaje es necesario para que el papel de filtro con la sección pueda flotar, asegurando su viabilidad y supervivencia durante el cultivo.
- viii. Se rellena con 350 µm de medio de cultivo sin que cubra el tejido.
- ix. Se mantiene en estufa durante 7 días a una temperatura de 37°C y 5% CO₂. Cambiando el medio cada 2 días.
- x. Se añade BrdU al medio de cultivo cada 72 horas (10µl de solución stock de BrdU por pocillo).

7. Preparación histología de las muestras

Una vez finalizado el cultivo, la totalidad de las muestras quedan divididas en dos grupos, cada uno constituido por 3 muestras experimentales y 3 controles, con el fin de llevar a cabo el análisis de proliferación celular por técnicas inmunohistoquímicas mediante dos metodologías diferentes: análisis de la expresión de BrdU in toto y en cortes transversales de muestras incluidas en parafina.

8. Inclusión en parafina

Inicialmente las muestras, dispuestas sobre papel Milipore, fueron depositadas en una placa de vidrio con fijador Carnoy, donde fueron mantenidas durante 5 minutos, tiempo en el cual se aprecia que el papel de filtro azul empieza a desteñir. Después se cambia el Carnoy y en él se deja 1 hora aproximadamente en agitación suave. Se procedió entonces a completar la deshidratación del tejido mediante sucesivos pases de alcoholes, con agitación suave, iniciando con etanol 96% durante 30 minutos y luego etanol 100%, dos pases de 30 minutos cada uno. Después de la deshidratación, las muestras fueron transparentadas en Xilol, dos pases de 5 puntos cada uno. Finalmente, se procedió a su inclusión en parafina durante dos horas en estufa a 58°C permitiendo luego su solidificación en bloques de parafina para su posterior corte en secciones transversales seriadas, de 8 µm de espesor. Estas últimas fueron recogidas en porta objetos de cristal tratados con 3-aminopropil-trietoxisilano para favorecer la adherencia, se secaron a 37°C durante 24 horas y posteriormente fueron empleados para su análisis inmunohistoquímico.

9. Inmunohistoquímica

La técnica de Inmunohistoquímica combina elementos histológicos, inmunológicos y bioquímicos y nos permite detectar la presencia y la localización histológica de un antígeno específico en la muestra de estudio. Se llevaron a cabo las siguientes técnicas inmunohistoquímicas.

9.1. Inmunohistoquímica con anticuerpos anti-BrdU en muestras In toto

La técnica consiste en realizar una inmunohistoquímica con un tejido de 300 µm de grosor lo que permite valorar la presencia de núcleos BrdU positivos en toda la extensión de la pieza cultivada de tejido. Esta técnica nos permite hacer una reconstrucción tridimensional de todo el tejido que nos permite determinar la ubicación de las células a estudiar en él.

La bromodeoxiurina (BrdU) es un análogo sintético de la timidina capaz de incorporarse a las células durante la fase de síntesis de DNA.

Esto nos permite, mediante marcaje con anticuerpos anti-BrdU, identificar las células que están en fase de proliferación durante el cultivo in vitro. Por tanto, nos permite estudiar la proliferación celular en la médula espinal de ratones adultos.

La técnica comienza fijando el tejido en Carnoy, manteniéndolo sumergido durante 150-180 minutos a temperatura ambiente. Entonces se lava con alcohol al 50% y luego se lava con agua corriente en dos pases de 5 minutos cada uno. Posteriormente se incubaba con HCl 2M durante 60 minutos para ocasionar la desnaturalización de DNA y exponer el antígeno. El HCl se neutraliza usando buffer borato 0,1M pH8,5 durante 10 minutos. Se lava con agua y TBS 3 veces, 5 minutos cada vez. Se procede a la permeabilización del tejido con TTBS durante una hora. Pasado ese tiempo, se da inicio al protocolo de inmunomarcaje. Se utiliza como anticuerpo primario, el anticuerpo monoclonal anti BrdU de ratón (monoclonal Mouse anti-bromodeoxyuridine, DaKO, Ref.: M7240), dilución 1:100, durante 24h, a 4°C en cámara húmeda.

Al día siguiente se lava 3 veces durante 20 minutos con TBS. Se añade el anticuerpo secundario Antimouse Ig G-Alexa 594 (Invitrogen. Ref.: 10680), dilución 1/1000, durante 24h, a 4°C en cámara húmeda.

Pasado ese tiempo, se procede a lavar como se indicó anteriormente y se lleva a cabo el montaje de las muestras en medio acuoso específico para fluorescencia, para realizar entonces las observaciones mediante microscopía laser confocal.

9.2. Inmunohistoquímica con anticuerpos anti-BrdU en secciones histológicas de muestras incluidas en parafina

El primer paso fue la desparafinación de las secciones mediante dos pases de 10 minutos por Xilol. Posteriormente dos pases de 7 minutos por los siguientes alcoholes: 100%, 96% 80% y 50% con el fin de rehidratar el tejido. Se lavó la muestra en agua corriente durante 15 minutos.

Se desnaturalizó la muestra mediante ácido clorhídrico (HCl) 2M a 37°C durante 1 hora para conseguir que la BrdU quede accesible y pueda unirse el anticuerpo. Se procede a la neutralización de HCl mediante buffer borato 0,1M pH 8,5 10 minutos. Después se lava con agua destilada y TBS 3 veces durante 5 minutos cada uno. Permeabilizamos el tejido con TTBS durante 15 minutos. Cuando ha pasado el tiempo, se procede al inmunomarcaje. Se utiliza

como anticuerpo primario, un anticuerpo monoclonal anti BrdU de ratón (monoclonal Mouse anti-bromodeoxyuridine, DaKO). Dilución 1:100 durante 24h a 4°C en cámara húmeda.

Al día siguiente se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS y se añadió el anticuerpo secundario (Goat anti-mouse, Mouse ExtrAvidin® Peroxidase Staining Kit, Sigma) dilución 1:20 en TTBS durante 60 minutos. Tras lavar 3 veces con TBS durante 5 minutos, se añade extravidina, dilución 1:20 en TTBS. Se deja 10 minutos.

Pasado el tiempo, llevamos a cabo el revelado con diaminobencidina (DAB, Sigma). Una vez obtenido el resultado deseado, se detuvo el revelado con agua destilada. Por último se hizo el montaje con medio eukitt®.

10. Estudio de proliferación celular. Ratones FGF2 KO frente ratones WT

Para comparar la proliferación de las células precursoras existentes en la médula espinal adulta entre un ratón wild-type (WT) y un ratón knockOut (KO) para FGF2 ($Fgf2^{tm1Doe}/Fgf2^{tm1Doe}$; Mice homozygous for the $Fgf2^{tm1Doe}$ targeted-mutant allele, The Jackson Laboratory).

Los ratones FGF-2^{-/-} y FGF-2^{+/+} tipo salvaje fueron adquiridos al “The Jackson Laboratory” (Bar Harbor, Maine; Stock Number: 003256). El ratón fue generado por medio de una delección dirigida, que reemplazó una porción de 0,5 kb del gen FGF2, incluyendo 121 pb de la región promotora proximal y el exón 1 completo, utilizando un minigen Hprt. El genotipo de cada ratón fue confirmado por PCR de acuerdo al protocolo proporcionado por “The Jackson Laboratory”.

Para llevar a cabo el análisis de proliferación, aplicamos inyecciones intraperitoneales de BrdU a los animales de experimentación. Se administraron dos dosis intraperitoneales de 60 microgramo/gramo peso de BrdU separadas 24 h. A las 24 horas de la última dosis, se procedió a sacrificar al animal. Se extrajo la médula espinal como se detalló en el punto 5. Posteriormente se procesa el tejido en 5 pasos: fijación, deshidratación, transparentación, inclusión, y formación de bloques.

Para la fijación se introdujo la médula espinal en solución Caroy durante 2 horas.

Pasado ese tiempo se deshidrató, mediante pases por alcoholes, siendo el primero de 96% (se dejó toda la noche) y 100% (2 horas) en agitación suave. Posteriormente se aclaró con xilol, dos pases cada uno de una hora. Finalmente se incluyó en parafina líquida.

Una vez obtenidos los cortes en portaobjetos, se seleccionan los más adecuados para realizar la inmunohistoquímica para detección de BrdU.

11. Estudio de la morfología de tejido medular de ratón adulto

Con el objetivo de observar la morfología de las células que forman el tejido medular y la posición relativa, se utiliza una médula espinal de ratón adulto fijada en Carnoy incluida en bloques de parafina, a los que se les realiza unos cortes de 8µm de espesor. (Protocolo detallado con anterioridad)

12. Tinción de secciones histológicas con hematoxilina-eosina

Los cortes 8µm de espesor, en primer lugar serán hidratados mediante pases por diferentes alcoholes (100, 96...), se lavan a continuación con agua destilada. Posteriormente se sumergen durante 5 segundos en hematoxilina. Se vuelve a lavar con agua destilada antes de sumergirlos en eosina durante 25". Se lavan de nuevo con agua destilada y se procede a la deshidratación de las muestras y montaje con medio eukitt®.

13. Contaje de células con anticuerpos anti-BrdU

Se realizó el contaje mediante imágenes de secciones marcadas con a BrdU. Se adquirieron un número determinado de imágenes de cada una de las zonas de la médula a estudiar y se contó el numero de células que habían incorporado BrdU a su interior.

- En cortes histológicos incluidos en parafina se obtuvieron las imágenes con microscopio convencional utilizando 40x. Los vasos sanguíneos también van a aparecen marcados, pues los eritrocitos contienen peroxidasa, una enzima que reacciona con el anticuerpo secundario dando color marrón característico. Por lo que durante el contaje, se tiene presente este hecho y se diferencia entre núcleos neuronales BrdU positivos y vasos sanguíneos (presentan una morfología característica).
- En la inmunohistoquímica In toto se procedió a hacer el contaje de células siguiendo el mismo sistema anterior pero en imágenes obtenidas mediante microscopio láser confocal.
- Para el contaje de núcleos BrdU positivos en el KO y WT, al estar el tejido con su morfología completa, se realiza el contaje de las células alrededor del canal medular.

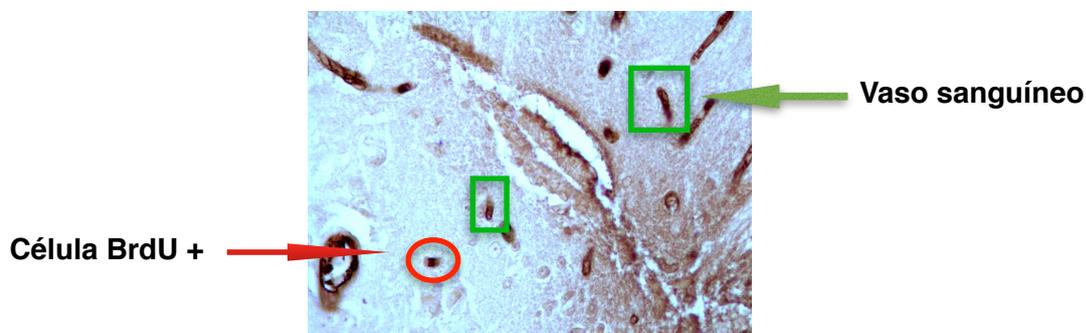


Figura 5: Imagen de sección de médula espinal WT con tinción de BrdU. (aumento de 40x). Células rodeadas por círculos rojos son BrdU positivas. Las células rodeadas por rectángulo verdes son células sanguíneas.

14. Análisis estadístico

Se compararon las muestras controles con las muestras experimentales para observar la diferencia de replicación celular entre ambas muestras.

Para el análisis de los datos hemos empleado el promedio de núcleos BrdU positivos con el error estándar y la significación estadística se midió mediante un test de Student de doble cola.

VI. RESULTADOS

Se distinguen dos etapas, una orientada a la conocer la influencia de CSF-e en los precursores neuronales presentes en la médula espinal adulta de ratón y la segunda etapa va a ir orientada a conocer la implicación que tiene el factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF2) en la replicación de precursores medulares en un ratón adulto KO.

1ª Etapa de experimentación: Cultivo organotípico.

Tras la realización de cultivo organotípico, como se explicó en el apartado de material y métodos, las muestras, tanto experimentales como controles, fueron divididas para analizar la proliferación celular mediante 2 metodologías diferentes, In-toto y cortes transversales incluidos en parafina.

El primer paso, para poder analizar la proliferación celular y determinar la zona más idónea para realizar dicho análisis, se comparan la morfología de las secciones medulares sometidas a cultivo con secciones medulares de ratón adulto fijadas tras su extracción.

Para ello, empleamos la tinción de Hematoxilina-Eosina, conocida como el método más popular utilizado en Histología y Medicina diagnóstica. La hematoxilina, por ser catiónica, tiñe estructuras ácidas en tonos azules y púrpura (núcleos celulares) y la eosina tiñe componentes básicos en tonos rosas, gracias a su naturaleza aniónica (citoplasmas).

Como se observa en la figura 6, podemos comprobar que las muestras que han sido sometidas a cultivo organotípico in vitro muestran alteraciones morfológicas que afectan principalmente a la sustancia blanca. Dichas alteraciones, están relacionadas con el procesamiento al que han sido sometidas (cultivo, fijación, inserción en parafina, cortes transversales ...) por los que han perdido parcialmente su estructura, solo identificándose la zona gris de la blanca en los cortes medulares.

Se definió que las zonas de conteo en las secciones medulares sometidas a cultivo organotípico usando tanto la metodología In-toto como los cortes de parafina, serían aquellas zonas con mayor número de células que han incorporado BrdU, ya que existe una disminución de la capacidad para reconocer alguna estructura en dichas secciones.

Elaboraremos una segunda división para poder analizar por separado la proliferación celular de las dos metodologías diferentes que empleamos para revelar los resultados.

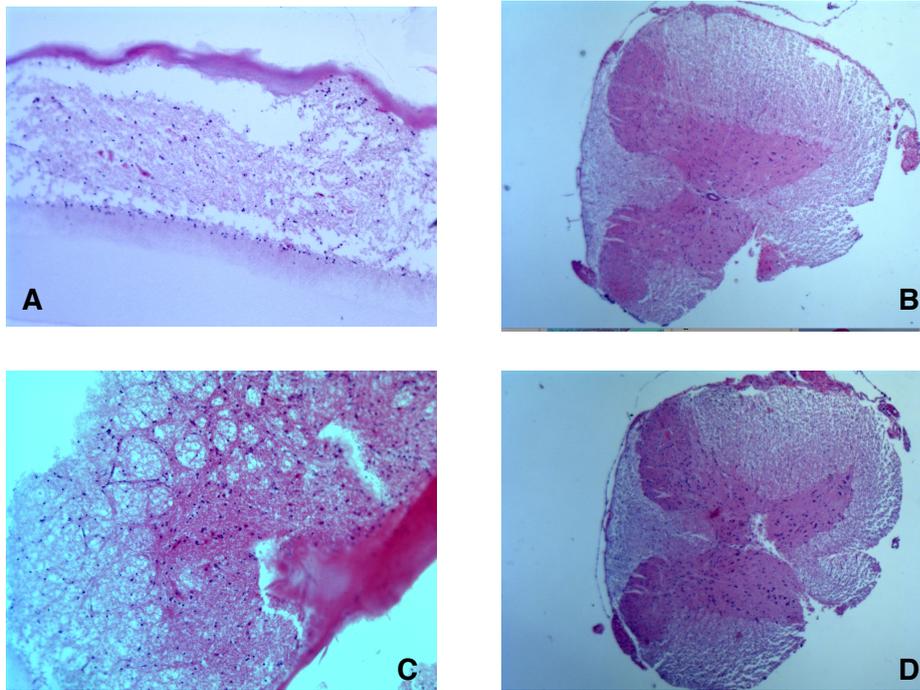


Figura 6: Resultado de la tinción con hematoxilina-eosina en cortes de médula espinal torácica de ratón adulto de 8mm de espesor. (A y C) pertenecen a médula de cultivo organotípico de ratón adulto. Siendo (A) muestra con influencia de PBS y (C) muestra experimental activada con CSF-e. (B y D) son muestras controles fijadas con Carnoy después de su extracción.

1.1 Análisis de la proliferación celular en secciones medulares de 300 μ m de espesor mediante inmunohistoquímica In-toto para células BrdU positivas.

Una vez finalizado el cultivo organotípico, las secciones medulares fueron fijadas con Carnoy para poder procesarlas mediante inmunohistoquímica anti- BrdU.

Para demostrar la presencia de células BrdU positivas, se usaron fluorocromos, los cuales van a tener una unión específica en el núcleo de las células que hayan incorporado BrdU a su interior. Para visualizarlo, usaremos un microscopio láser confocal. Las células positivas se marcarán con coloración roja, debido a que se eligió el fluorocromo con una longitud de onda de 594nm.

Solo se contaron las células que han expresado en su núcleo la presencia de BrdU.

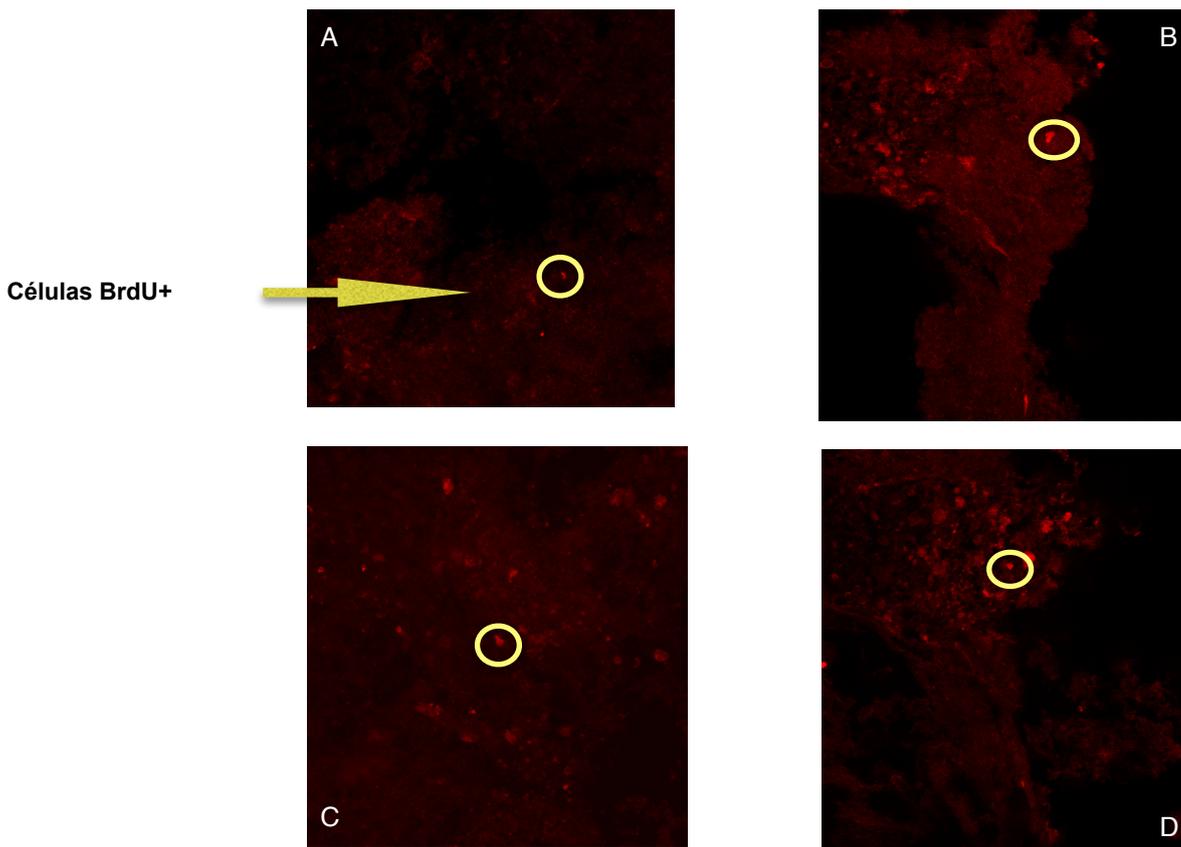


Figura 7: Análisis de la proliferación celular en secciones medulares con un espesor de 300 μm (In-Toto). En las imágenes (A-C): observamos células control que expresan marcaje de BrdU en su núcleo. (B-D): Células con influencia de Csf-e que expresan marcaje de BrdU en su núcleo. Destacando en la figura B y D el aumento de proliferación. Fotos realizadas con microscopía confocal. (Las imágenes que se muestran se eligieron por ser las más representativas del área que se quiere estudiar).

Si observamos ambos tipos de imágenes y se contrastan, se puede observar un aumento moderado de la proliferación en la médula espinal adulta de las muestras con influencia de CSF-e respecto a las muestras controles.

Para tener datos numéricos, se utilizó un análisis estadístico de las 28 imágenes cuantificadas. (14 experimentales y 14 controles)

Realizamos una gráfica, donde se obtiene una comparativa entre los datos controles y los datos experimentales. Para estimar si existe entre ambos una diferencia significativa se ha realizado una Tabla de Student de doble cola.

En cada imagen se contabilizaron todas las células con núcleo BrdU positivo en médula espinal adulta.

	Media aritmética	Error estándar
Control	2,57143	0,41555
CSF-e	4,71429	0,51812

Tabla 1. En la siguiente tabla se muestra la media aritmética de las células control y tratadas con CSF-e así como el error estándar de cada una.

Estudio de la proliferación y replicación.

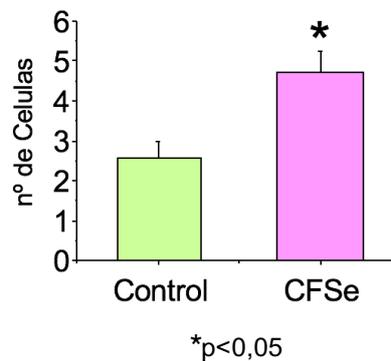


Figura 8: Histograma representativo donde se compara el promedio de células BrdU+ halladas en cada imagen para cada grupo experimental.

En la tabla 1 y figura 8 se representa un resumen de el análisis estadístico de los resultados obtenido por el conteo de núcleo positivos para Brdu. Se valora la neurogénesis a partir de las precursores neuronales existentes en la médula espinal adulta.

El valor de p, ha dado un resultado $< 0,05$, arrojando una diferencia significativa entre muestras controles y muestras experimentales.

1.2 Análisis de la proliferación celular en cortes transversales de 8 μ m de espesor de secciones medulares incluidas en parafina, mediante inmunohistoquímica anti-BrdU.

Al igual que en el apartado anterior, cuando finalizó el cultivo organotípico, las muestras van a ser tratadas, pero como variación, estas muestras fueron incluidas en parafina para poder realizar cortes transversales de 8 μ m de espesor.

Se observan los diversos cortes transversales y se eligen los que mejor tejido medular presentan para realizar el estudio de inmunohistoquímica anti-BrdU en la que los núcleos BrdU positivos van a mostrar con coloración marrón y punteada en su interior siendo este un marcaje característico. Se han cualificado 20 fotos de cada condición experimental (CSF-e/PBS), contando de manera exclusiva las células BrdU positivas, diferenciándolas de las células sanguíneas y perivasculares.

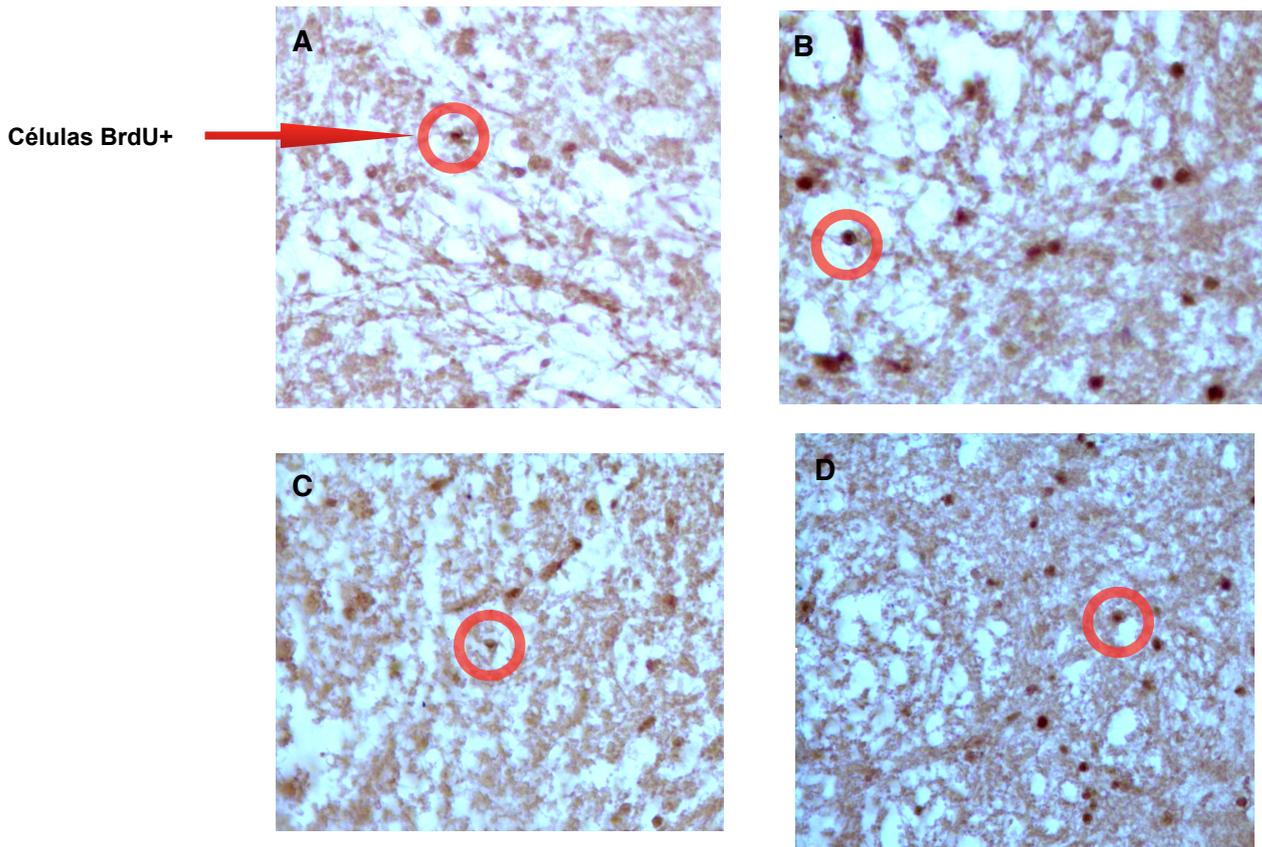


Figura 9: Análisis de la proliferación celular en cortes transversales de médula espinal . En las imágenes (A-C): observamos células control que expresan marcaje de BrdU en su núcleo. (B-D): Células con influencia de Csf-e que expresan marcaje de BrdU en su núcleo. Destacando en la figura B y D el aumento de proliferación. Fotos realizadas con aumento 40x en microscopio convencional óptico.

Si nos detenemos a observar ambas imágenes, se puede ver una diferencia significativa a simple vista.

Con los datos recogidos del conteo celular, elaboramos una tabla y una gráfica para poder comparar ambos resultados.

	Media aritmética	Error estándar
Control	7,9	0,66451
CSF-e	13,6	1,15713

Tabla 2. En la siguiente tabla se muestra la media aritmética de las células control y tratadas con CSF-e así como el error estándar de cada una.

Estudio de la proliferación y replicación.

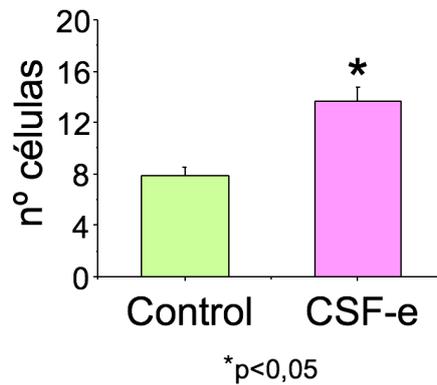


Figura 10: Histograma representativo donde se compara el promedio de células BrdU+ halladas en cada imagen para cada grupo experimental.

En el resumen del análisis estadísticos de los resultados, observamos un aumento significativo entre el tejido medular con influencia de Csf-e frente al tejido control siendo su p valor < 0,05.

2ª Etapa de experimentación: Análisis de la actividad de replicación en médula de ratón KO para FGF2.

Como expusimos anteriormente, es fundamental determinar la zona ideal de contaje de células BrdU positivas en el tejido medular, para ello, realizamos una tinción de Hematoxilina-eosina.

A diferencia de la fase 1ª de experimentación, la morfología presente en las médulas KO y WT de ratón esta bien conservada, pudiéndose identificar la zona gris de la zona blanca.

Una característica clave que se observa es el canal medular, como describimos en la introducción, es la estructura donde se encuentran las células ependimarias consideradas precursores neuronales.

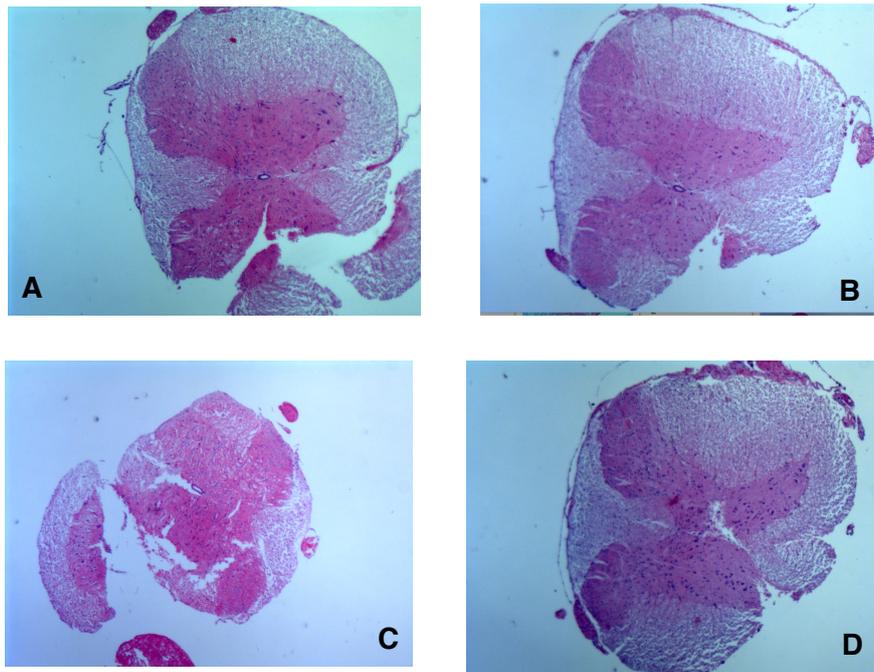


Figura 11: Tinción con hematoxilina/eosina en cortes transversales de médula espinal de ratón adulto de 8µm de espesor. (A y C) pertenece a médula de ratón KO de FGF2. (B y D) son muestras controles fijadas con Carnoy después de su extracción.

2.1 Análisis de la proliferación celular en cortes transversales de 8 µm de espesor de secciones medulares incluidas en parafina de KO y WT, mediante inmunohistoquímica anti-BrdU.

Para determinar la capacidad mitogénica de FGF2 en la médula espinal adulta, contabilizamos las células BrdU positivas en su núcleo. **figura 12 (circulo verde).**

En esta ocasión, para realizar el conteo se han tenido en cuenta 30 imágenes de médula WT y 30 imágenes de médula KO para FGF2.

En las imágenes a simple vista, no parece que haya cambios significativos entre ambas.

A su vez se realiza una tabla y una gráfica para obtener datos estadísticos.

Se compara si existe diferencias significativas entre KO y WT en la replicación medular.

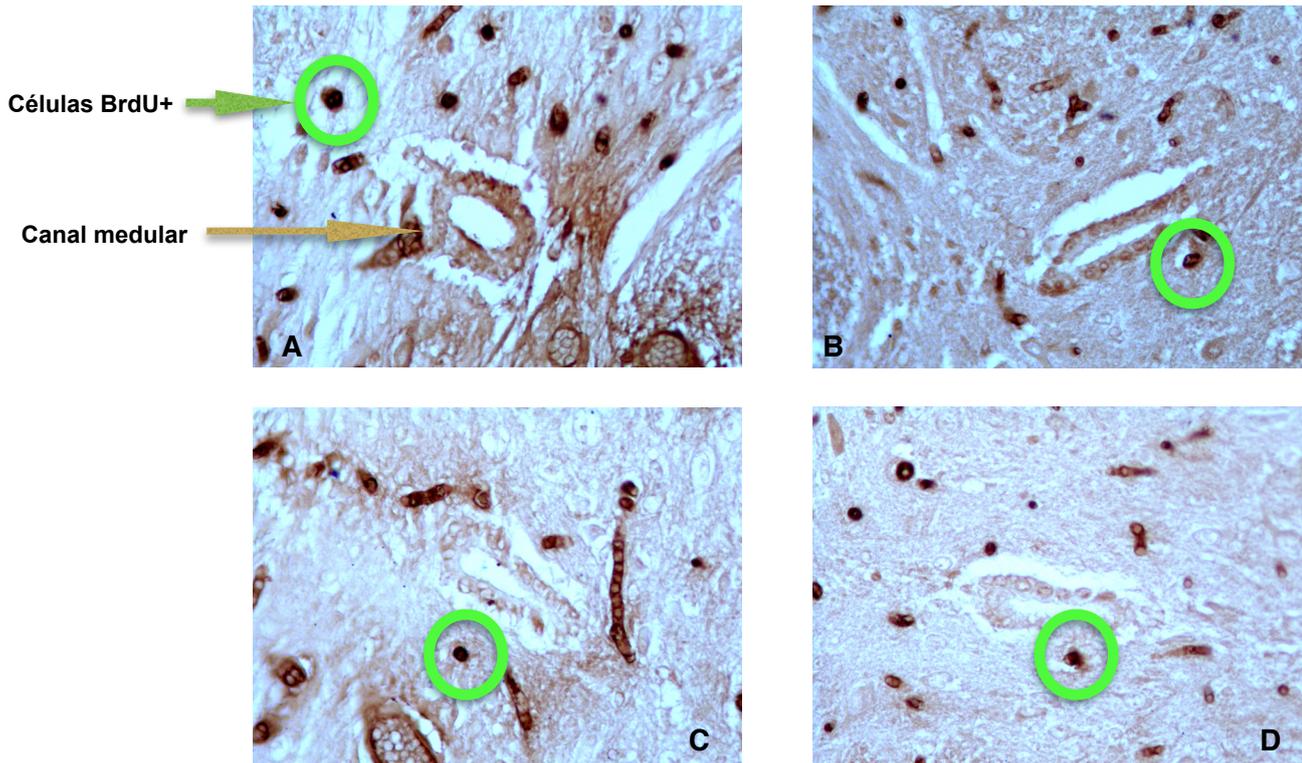


Figura 12: Análisis de la proliferación celular en cortes de médula espinal de ratón adulto KO y WT . En las imágenes(A-C): observamos células KO de FGF2 que expresan marcaje de BrdU en su núcleo. (B-D): Células de ratón WT que expresan marcaje de Brdu en su núcleo. Fotos realizadas con aumento 40x en microscopio convencional óptico enfocando al canal medular.

	Media	Error estándar
WT	5,633	0,41379
KO	5,000	0,36828

Tabla 3. En la siguiente tabla se muestra la media aritmética de las células WT y células KO así como el error estándar de cada una.

Estudio de la proliferación y la replicación celular

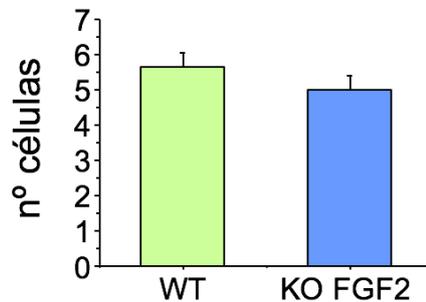


Figura 13: Histograma representativo donde se compara el promedio de células BrdU+ halladas en cada imagen para cada grupo experimental.

Con los datos estadísticos obtenidos, no se observan diferencias significativas entre médulas de ratones KO y médulas de ratones WT, siendo su p valor $>0,05$. Por lo que se valora la no participación del mitógeno FGF2 en la neurogénesis a partir de precursores neuronales en médula de ratón adulto.

Como conclusión final de los resultados podemos decir que existe una influencia positiva de CSF-e en las médulas precursoras neuronales presentes en la médula espinal de un ejemplar adulto, por lo que puede ser considerado como un activador y potenciador de replicación. Al contrario de lo que se pensaba, el FGF2 no ejerce un efecto en la replicación celular.

VII. DISCUSIÓN

A pesar de los esfuerzos de la medicina por minimizar el impacto de las enfermedades o lesiones del sistema nervioso central (SNC), la incapacidad de éste de recuperarse por completo conlleva a menudo déficits neurológicos permanentes. Este problema ha motivado la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para la regeneración del tejido lesionado, entre ellas la terapia con células madre neurales. Hasta el momento se conocen dos centros proliferativos en el cerebro de mamíferos adultos donde residen células madre: la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales y el giro dentado del hipocampo.

Una lesión frecuente del SNC es la que afecta a la médula espinal. No obstante existen pocas evidencias de que exista actividad mitótica en la médula espinal adulta. Diversos estudios han demostrado un aumento de replicación después de realizar una laminectomía en la médula espinal adulta. Estas nuevas células surgen de los precursores con potencial neurogénico que pueden estar en el revestimiento ependimario de la médula espinal de adultos . (Weiss et al, 1996)

Haciendo una valoración objetiva de nuestros resultados, analizaremos los mismos, teniendo en cuenta los objetivos planteados en el proyecto.

En general, los resultados de este trabajo muestran un aumento de la proliferación y expansión de los precursores del nicho neurogénico en médula espinal adulta en presencia de CSF-e respecto a los controles de las muestras. Como sabíamos en estudios anteriores de nuestro equipo, el CSF-e es un agente mitogénico y neurogénico potente. (Martín et al., 2006), (Gato & Desmond, 2009), (Alonso, Martín, Carnicero, Bueno, & Gato, 2011). Comprobamos que los precursores neuronales presentes en la médula torácica adulto de ratones responden de manera similar a los del encéfalo.

En primer lugar, se comprobó cómo el tejido medular se mantiene vivo durante todo el proceso de cultivo organotípico. Ya que se observan células que han incorporado BrdU a su interior mediante el proceso de síntesis celular. Verificamos que nuestra técnica de cultivo cerebral se puede extrapolar a la médula espinal, manteniéndose la viabilidad del mismo.

Mediante el estudio con dos metodologías diferentes las muestras de cultivo organotípico a estudiar (Inclusión en parafina e In-toto) observamos que ha aumentado de manera significativa de los precursores marcados la proliferación celular y la supervivencia en las muestras tratadas con CSF-e respecto a las muestras controles.

No se observa diferenciación en los resultados utilizando los dos tipos de metodología. Ambos métodos dan resultados semejantes en torno a la proliferación y expansión celular.

Podemos deducir que el CSF-e en la médula espinal puede estar implicado en el desarrollo de nuevas células neuronales. Como mencionamos a lo largo del trabajo, la composición del CSF-e cambia considerablemente respecto al CSF adulto. Los factores que ejercen dicha influencia siguen siendo desconocidos.

Ha sido descrito por números autores, la importancia de FGF2 como señal extrínseca que promueve a proliferación de células progenitoras neurales, tanto en vivo como in vitro, aumentando el inmunoreactividad después de una lesión medular. Kojima y colaboradores demostraron que las células de la capa endimarias de la médula espinal adulta de mamífero es análoga a la zona subventricular o la capa endimial del ventrículo lateral a la expresión de FGF2 y que este factor tiene un efecto mitógeno sobre las células precursoras del epéndimo. (Kojima. A & Tartor. C, 2000)

Los resultados obtenidos en este trabajo, refleja que no existe una diferencia significativa entre muestras de ratón KO FGF2 y muestras de ratón WT control. Lo que nos lleva a pensar que el FGF2 no resulta esencial para la proliferación neuronal en la médula espinal, existiendo otros factores que compensen el déficit, teniendo funciones limitadas en la neurogénesis en adultos.

VIII. CONCLUSIONES

- Existe nicho neurogénico en médula espinal de ratón adulto y se localiza entorno al canal medular.
- CSF-e activa de forma significativa el proceso de replicación de los precursores neuronales medulares.
- El FGF2 no parece ser un factor mitogénico clave del CSF-e en el nicho medular.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, M. I., Martín, C., Carnicero, E., Bueno, D., & Gato, A. (2011). Cerebrospinal fluid control of neurogenesis induced by retinoic acid during early brain development. *Developmental Dynamics*, 240(7), 1650–1659. <http://doi.org/10.1002/dvdy.22657>
- Arias-Carrión O1, Olivares-Buñuelos T, D.-C. R. (2007). Neurogenesis in the adult brain. *Rev Neurol*, 1-15(44(9)), 541–50.
- Altman, J. and Das, G. D. (1965) autoradiographic evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats†Joseph Altman and Gopal D. Das. Version of Record online: 8 OCT 2004 DOI: 10.1002/cne.901240303.
- Barnabé-Heider, F., Göritz, C., Sabelström, H., Takebayashi, H., Pfrieder, F. W., Meletis, K., & Frisén, J. (2010). Origin of New Glial Cells in Intact and Injured Adult Spinal Cord. *Cell Stem Cell*, 7(4), 470–482. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.014>
- Bisbal Velasco, V. (2015). Trasplante de precursores neurales derivados de médula espinal adulta en el rescate funcional de lesiones medulares crónicas. Moncada (Valencia) : Universidad CEU Cardenal Herrera, Facultad de Veterinaria, Departamento de Medicina y Cirugía Animal.
- Deleyrolle, L. P., & Reynolds, B. A. (2009). Isolation, Expansion, and Differentiation of Adult Mammalian Neural Stem and Progenitor Cells Using the Neurosphere Assay. In D. Gordon & J. N. Scolding (Eds.), *Neural Cell Transplantation: Methods and Protocols* (pp. 91–101). Totowa, NJ: Humana Press. http://doi.org/10.1007/978-1-60327-931-4_7
- Faigle, R., & Song, H. (2013). Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(2), 2435–2448. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.002>
- García Verdugo, José Manuel Gil-Perotín, S. (2014). No Title Células madre neurales: ¿las grandes reparadoras? *Mente Y Cerebro. Neurología*, nº67.
- Gato, A., & Desmond, M. E. (2009). Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent regulators of embryonic brain growth, morphogenesis and histiogenesis. *Developmental Biology*, 327(2), 263–272. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.12.029>
- Hagg, T. (2016). Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, 28(11), 589–595. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2005.08.009>
- Kempermann, G., WisKott, L., & Gage, F. H. (2004). Functional significance of adult neurogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(2), 186–191. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2004.03.001>
- Kojima, A Tator, C H. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2 cause proliferation of ependymal precursor cells in the adult rat spinal cord in vivo. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 59 (8), 687-97.
- Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264(5162), 1145–1148. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/264/5162/1145>.

- Martín, C., Bueno, D., Alonso, M. I., Moro, J. A., Callejo, S., Parada, C., ... Gato, A. (2006). FGF2 plays a key role in embryonic cerebrospinal fluid trophic properties over chick embryo neuroepithelial stem cells. *Developmental Biology*, 297(2), 402–416. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.010>
- Moreno-Manzano, V., Rodríguez-Jiménez, F. J., García-Roselló, M., Laínez, S., Erceg, S., Calvo, M. T., ... Stojkovic, M. (2009). Activated spinal cord ependymal stem cells rescue neurological function. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 27(3), 733–43. <http://doi.org/10.1002/stem.24>
- Pastrana, E., Cheng, L.-C., & Doetsch, F. (2009). Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(15), 6387–6392. <http://doi.org/10.1073/pnas.0810407106>
- Peretto P, Paredes RG. (2014) Social Cues Adult Neurogenesis, and Reproductive Behavior. In: Mucignat-Caretta C, editor. *Neurobiology of Chemical Communication*, Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis;. Chapter 13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK200979/>
- Reynolds y Weiss,(1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707-1710.
- Shihabuddin L Horner P Ray J Gage F(2000). Adult Spinal Cord Stem Cells Generate Neurons after Transplantation in the Adult Dentate Gyrus. *The Journal of Neuroscience* , 20 (23), 8727–8735.
- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., & AC, P. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci*, 16, 7599–7609.
- Yeager, A. (2015). Rethinking which cells are the conductors of learning and memory. *Science News*, 188(no,4), 18.
- Zhou, Y., Xu, Q., Li, D., Zhao, L., Wang, Y., Liu, M., ... Liu, Y. (2013). Early neurogenesis during caudal spinal cord regeneration in adult GekKO japonicus. *Journal of Molecular Histology*, 44(3), 291–297. <http://doi.org/10.1007/s10735-012-9466-3>

ANEXO I

ABREVIATURAS

- SN: Sistema Nervioso
- SNC: Sistema Nervioso Central
- ZSV: Zona Subventricular
- ZSG: Zona Subventricular del Giro Dentado
- CPN: Células Progenitoras Neuronales
- FGF2: Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2
- EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico
- ME: Médula Espinal
- CSF-e: Fluido Cerebroespinal Embrionario
- HBSS: Hank's Balanced Salt Solution
- FBS: Suero Bovino Fetal
- BrdU: Bromodeoxiurina
- KO: KnockOut
- WT: Wild-Type