



ÍNDICE

Introducción

- 1) Planteamiento general pág 3
- 2) Las células Madre o Progenitoras como base para los procesos de neurogénesis pág 5
- 3) El nivel de actividad neurogénica depende del entorno de los precursores de los Precursores: concepto de Nicho Neurogénico pág 8
- 4) El CSF es un componente clave del “nicho neurogénico” pág 10

Material y métodos

- 1) Preparación del cultivo pág 13
- 2) Estabulación, anestesia y apareamiento de los animales de laboratorio pág 13
- 3) Obtención de CSF de embriones de ratón pág 14
- 4) Obtención del tejido cerebral pág 15
- 5) Disgregación tisular de la zona subventricular pág 16
- 6) Inmunoselección de precursores neuronales indiferenciados de la ZSV pág 17
- 7) Cultivo “in vitro” de precursores neuronales de la ZSV: Condiciones experimentales pág 19
- 8) Determinación inmunocitoquímica del tipo y grado de maduración celular pág 22
- 9) Valoración de los resultados pág 24



Resultados

1ª Fase experimental: Expansión de población
de células precursoras pág 25

2ª Fase experimental: Efecto del CSF-E pág 27

Conclusiones pág 32

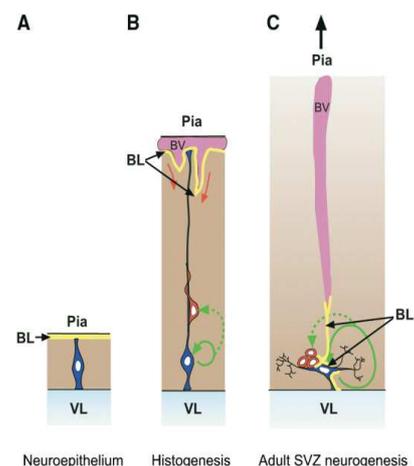
Bibliografía pág 34

INTRODUCCIÓN

1) Planteamiento general:

Uno de los elementos claves en la evolución de los seres vivos, es el desarrollo de un sistema especializado, el Sistema Nervioso, capaz de establecer una relación interactiva con el entorno, al tiempo que controla y organiza el comportamiento del resto de las células de los organismos complejos. Las capacidades de este sistema radican esencialmente en la existencia de un tipo altamente especializado de células, denominadas neuronas, cuya principal función es la de recepción, organización y transmisión de señales.

Al igual que la mayor parte de las células de nuestro organismo, las neuronas se forman por un proceso complejo de diferenciación, conocido como neurogénesis, a partir de células madre o precursoras. Hasta hace pocos años la neurogénesis era un proceso que se atribuía fundamentalmente al periodo embrionario y fetal y en menor medida a la etapa postnatal temprana, presuponiéndose que, en el cerebro adulto de los vertebrados superiores (al contrario que en algunos vertebrados inferiores), no existía un proceso de formación de nuevas neuronas, dada la compleja estructura del sistema nervioso central como tejido de la neurona como especie celular.



En la última década se ha acumulado una evidencia científica más que abundante, que demuestra que en el sistema nervioso central de los mamíferos superiores (incluidos los humanos), existen regiones en las que se localizan células madre o precursores neurales, con capacidad efectiva de generar nuevas neuronas que maduran (Gilbert 2006) y se integran en circuitos funcionales. Hasta el momento y aunque existe la sospecha de que podría haber más, solo se han tipificado dos regiones del cerebro adulto en las que existe actividad neurogénica en condiciones normales, una de ellas es la zona subventricular (ZSV), subyacente a la capa endimaria de la cara



lateral del ventrículo lateral y otra es la zona subgranular del giro dentado (GD) del hipocampo. Sin embargo, la capacidad neurogénica de estas dos regiones es limitada y decrece con la edad. Un concepto relevante a tener en cuenta es que la neurogénesis es un proceso continuo a lo largo de la vida, que tiene un periodo muy activo durante el desarrollo y que después va decayendo a lo largo de la vida del individuo (Merkle and Alvarez-Buylla 2006; Arias-Carrión 2007; Brazel and Rao 2004).

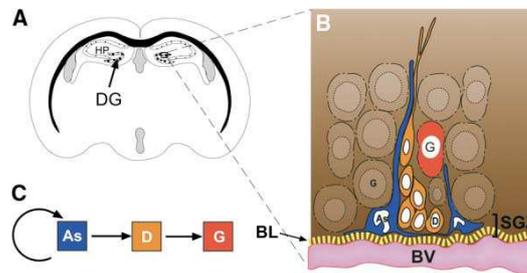
A pesar de lo anteriormente comentado, la existencia de una actividad neurogénica endógena en el sistema nervioso central de mamíferos adultos tiene un gran interés científico, y ha despertado grandes expectativas en el campo de las enfermedades neurodegenerativas, como estrategia terapéutica de reemplazo de neuronas funcionales dañadas (Okano et al. 2007-2008; Kaneco et al. 2011).

Sin embargo, el principal problema para el desarrollo de estas estrategias radica en la moderada actividad neurogénica del sistema nervioso central de los mamíferos adultos y la falta de evidencias de su capacidad para promover una neuroregeneración efectiva en caso de lesión neuronal localizada o difusa (Zhang et al. 2008; Kernie et al. 2010). En este sentido, existen numerosos estudios que demuestran que en condiciones patológicas de lesión neuronal, se produce una activación de la neurogénesis en el sistema nervioso central, demostrando que existe una notable reserva de capacidad neurogénica potencialmente desarrollable, sin embargo, la condiciones microambientales en la zona de la lesión dificultan la maduración e integración funcional de las neuronas recién formadas (Kaneco and Sawamoto 2009; Yamashita et al 2006; Liu and Guthrie 2011).

En este contexto, el estudio de los factores microambientales que participan en la activación y progresión de la neurogénesis a partir de los Progenitores neurales, puede ser clave para el desarrollo de este tipo de estrategias neuroregenerativas y, la etapa embrionaria, por ser la de mayor actividad neurogénica en condiciones fisiológicas, el ámbito de estudio más apropiado.

2) Las células Madre o Progenitoras como base para los procesos de neurogénesis

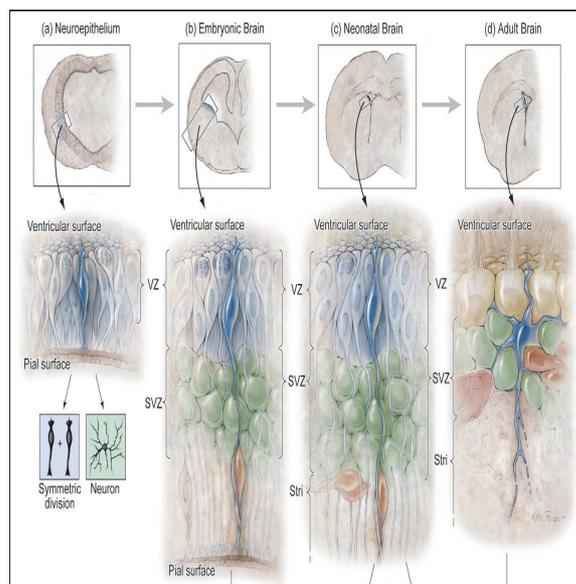
La gran cantidad de estudios realizados hasta la fecha demuestran que las nuevas neuronas, en el cerebro de los mamíferos adultos, se originan por un proceso de replicación y de diferenciación celular a partir de los denominados Progenitores Neurales (o células Madre), células de carácter



Alvarez-Buylla and Lim 2004

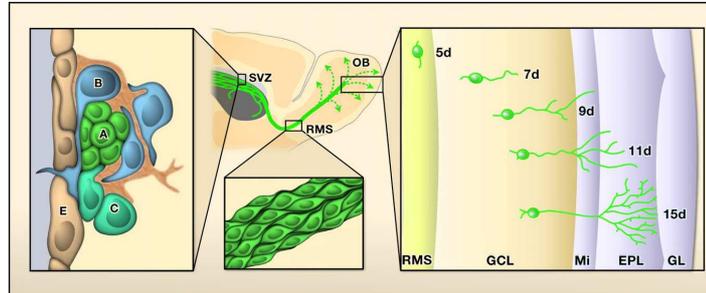
astrocitario localizadas en la ZSV y GD (Alvarez-Buylla- García-Verdugo 2002; Quiñones-Hinojosa et al 2006). Recientes estudios han demostrado que los Progenitores Neurales del cerebro adulto derivan de la denominada Glía Radial, células de carácter glial que se desarrollan en el periodo embrionario tardío y fetal y que a su vez derivan directamente de las células neuroepiteliales, que son considerados como los auténticos Progenitores Neurales. Por tanto lo que en principio parecían poblaciones distintas de Precusores Neurales a lo largo de la vida del individuo, se convierte en una estirpe celular común que tiene su origen en la etapa embrionaria temprana (tubo neural) como "Precusores Neuroepiteliales" y que evoluciona a través de la Glía Radial para persistir

como “Precusores Neurales o quiescentes del adulto” (Merkle and Alvarez-Buylla 2006; Khun and Blomgren 2011; Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009). Este concepto es de gran relevancia en nuestro estudio ya que al ser la misma estirpe celular, es posible que conserve su capacidad de respuesta a los estímulos del microambiente o nicho y que su escasa actividad neurogénica en el adulto sea por alteración de estos estímulos microambientales.



Merkle y Alvarez-Buylla 2006

En las etapas tempranas del desarrollo embrionario, tras la inducción de la placa neural y el proceso de Neurulación, se forman el denominado "tubo neural", cuyo extremo anterior es el esbozo del cerebro cuya pared epitelial está formada casi exclusivamente por los Precursores Neuroepiteliales, que a su vez delimitan una gran cavidad que contiene el fluido cerebroespinal embrionario (CSF-E). Esta población de Precursores neuroepiteliales, es



Zhao et al. 2008

la encargada de formar la mayor parte de las células del tejido nervioso. En estas etapas de desarrollo del cerebro, tienen lugar, dentro del esbozo cerebral múltiples mecanismos a nivel tisular, celular y molecular que generan procesos morfogénéticos (crecimiento, cambios morfológicos), emigraciones celulares, establecimiento de identidades posicionales, etc. Al mismo tiempo, los precursores neuroepiteliales se caracterizan por un comportamiento celular basado en: 1) un elevado índice de supervivencia celular; 2) una gran actividad mitótica que promueve una intensa y constante expansión de la población de precursores; y 3) el comienzo de un proceso de diferenciación, que en fases tempranas está dirigido hacia la neurogénesis y que en un breve espacio de tiempo se vuelve muy intenso. Este proceso de diferenciación neuronal con emigración periférica dentro del neuroepitelio hace que las neuronas se establezcan en su parte basal, dejando a los progenitores neuroepiteliales limitados a la parte del neuroepitelio que está en contacto con la cavidad del tubo neural, en la denominada zona ventricular donde se sigue manteniendo una intensa replicación y neurogénesis (Sanes et al 2002).

Uno de los primeros signos de comienzo de diferenciación glial es la aparición de unas células derivadas de las neuroepiteliales, que conservan sus extremos citoplásmicos unidos tanto a la superficie apical como basal y que son denominadas "Glía Radial" aunque en principio se les atribuyó un papel de soporte para la emigración periférica de las neuronas recién diferenciadas, en la actualidad se sabe que juegan un papel clave proporcionando la continuidad de las células progenitoras en el sistema nervioso central adulto (Merkle and Alvarez-Builla 2006).



Finalmente, con la diferenciación de las células endimarias a partir de las propias células neuroepiteliales, las que aún conservan sus características de precursores neuroepiteliales se agrupan en una capa que queda entre las células endimaria y el resto del tejido, zona que se conoce como "zona Subventricular" (Morshead 1998).

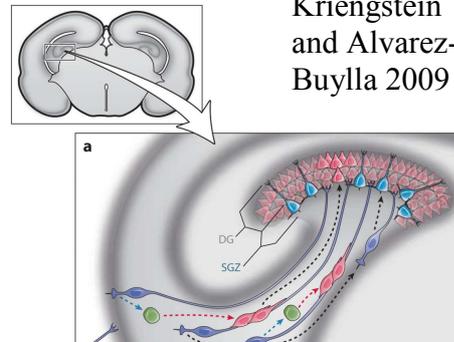
En los mamíferos adultos, la zona subventricular desaparece como tal en la mayor parte del encéfalo, excepto en la pared externa del ventrículo lateral del cerebro donde persiste adoptando una organización peculiar con la presencia de diversos tipos celulares. En primer lugar, en esta zona se localiza un tipo de astrocitos que derivan de la glía radial y que poseen las dos características que definen a las células madre, es decir capacidad de autorenovación (muy lenta) y totipotencialidad para generar cualquier tipo celular de carácter neuronal o glial, estas células se denominan "**Precursoses Neurales, quiescentes o células B**". Por otra parte, se ha identificado otro tipo de células que derivan de las anteriores y que tienen una gran actividad de replicación por lo que se denominan "**Precursoses altamente proliferativos o células C**" a los que se les atribuye la capacidad de expandir la población de precursores. Algunas de estas células, mediante un proceso denominado "mitosis asimétrica" se transforman en otro tipo celular en el que la capacidad de replicación es mucho menor y tiene su potencialidad restringida a células de carácter neuronal por lo que se denominan "**Precursoses neuronales indiferenciados o células A**" (Doetsch et al. 1999; Alvarez-Buylla and Lim 2004; Sawamoto et al. 2011). La transición entre estos tres tipos de células siguiendo la secuencia: B--C--A marca el proceso evolutivo de la neurogénesis. Los Precursoses neuronales indiferenciados desarrollan una capacidad de emigración por la banda migratoria rostral (RMS) hacia el bulbo olfatorio y bajo la influencia de estímulos apropiados, generan neuronas jóvenes que sufren un proceso de maduración funcional a interneuronas de la vía olfatoria (Zhao et al. 2008).

Sin embargo hay que tener en cuenta que en el entorno inmediato de esta estructura multicelular existen otros tipos como las células endimarias, neuronas y glía, estructuras vasculares, matriz extracelular, etc., que en la actualidad se considera que pueden ejercer una influencia sobre los anteriores tipos celulares.

En la otra región con capacidad neurogénica, que es el giro dentado del hipocampo, la estructuración y composición celular es más compleja y, según

investigaciones recientes, está separado en dos localizaciones o poblaciones celulares: los *Precursores quiescentes* y los *Precursores altamente proliferativos*, se localizan en la pared externa de la prolongación inferior del ventrículo lateral, mientras que los *Precursores indiferenciados o neuronales* se localizan en la capa subgranular del giro dentado, y se supone que existe un tránsito o emigración entre estas dos localizaciones. Cuando estos precursores sufren un proceso de diferenciación neuronal, emigran a la capa granular del giro dentado y se diferencian en células granulares. (Bull and Barlett 2005; Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).

En el caso de la zona subventricular, la neurogénesis que en ella se produce en condiciones fisiológicas, está relacionada con el recambio de interneuronas en el bulbo olfatorio, sin embargo se ha demostrado que en condiciones patológicas como la isquemia cerebral o las enfermedades neurodegenerativas, este nicho puede contribuir con su potencial



Kriegstein
and Alvarez-
Buylla 2009

neurogénico al establecimiento de mecanismos de regeneración tisular. En el caso del giro dentado del hipocampo, el nicho y su actividad neurogénica, ha sido relacionado con procesos de aprendizaje y establecimiento de memoria a corto plazo.

3) El nivel de actividad neurogénica depende del entorno de los precursores de los Precursores: concepto de Nicho Neurogénico.

En el cerebro de mamíferos adultos, la neurogénesis a partir de células precursoras, se basa en el desarrollo progresivo de tres mecanismos: el primero, la replicación celular, que implica la expansión de la población de precursores; el segundo, es el proceso de emigración, que en el caso de la zona subventricular es hacia el bulbo olfatorio a través de la RMS y en el caso del giro dentado del hipocampo es mucho más limitada y va desde la capa subgranular hacia la capa granular. Finalmente, el tercer proceso, que es simultáneo con el anterior, es la diferenciación hacia células gliales o neuronales y que tiene varias etapas o grados de maduración, especialmente en las

neuronas, hasta transformarse en una célula madura e integrada funcionalmente en el tejido nervioso.

Existen en la bibliografía múltiples estudios sobre la capacidad de respuesta a diferentes estímulos de los progenitores neurales y muchos de estos estudios provienen de cultivos in Vitro de

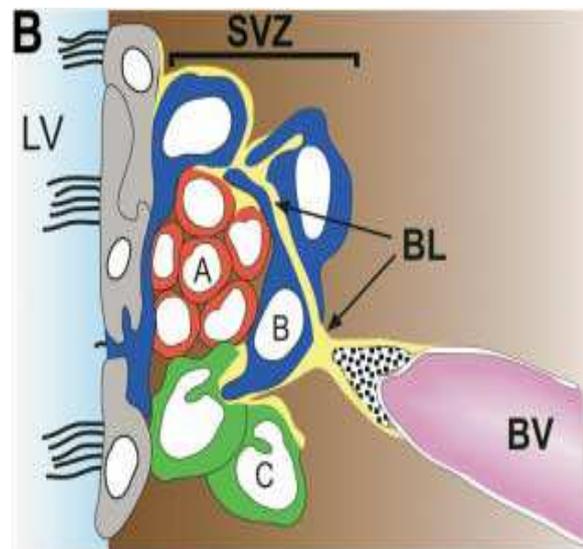
TABLE 1. Similarities and Differences Between Niche Components in the Embryonic and Adult CNS*

Niche component	Molecule(s)	Embryonic CNS	Adult CNS
Growth factor signaling	BMP	BMP2, 4, Noggin	BMP2, 4, R1A, R1B, Noggin
	FGF	FGF2, FGFR1, 3, 4	FGF2
	EGF	Present	Present
	Shh	Shh, Gli1, Gli2, Gli3	Shh, Gli1
	VEGF	Present	VEGF-C/VEGFR-3
	Wnt	SFRP-1, Fz5, 8, 9, β -catenin	T.B.D.
	PEGF	T.B.D.	Present
	TGF α	T.B.D.	Present
	PDGF	T.B.D.	Present
	Ephrin-Eph	Ephrin B1, A5, Eph A4, A7	Ephrin B2, B3, Eph B1, B3, A2, A4, A7
Cell-to-cell signaling	Notch	Notch 1, 3, Delta 1, Jagged	Notch 1, Jagged 1
	Cadherins	E-cadherin, N-cadherin	E-cadherin, N-cadherin
	Gap functions	Cx 26, 43, 45	Cx 26
	Laminins	Laminin α 2, α 4, α 5, β 2	Laminin(s)-chains unknown
Cell-to-ECM signaling	Integrins	α 6, α 7, β 1	T.B.D.
	Dystroglycan	Present	T.B.D.
	Syndecan	Syndecan 1, 4	T.B.D.
	Blood vessels	Developing, but present	Present and in contact with all cells in niche
CSF	Present	Present and flow controlled by ependymal cells	

Lathia et al 2007

células progenitoras que forman aglomerados celulares, denominados neuroesferas. La conclusión global de todos ellos es que para que estas células desarrollen un programa de replicación, migración, diferenciación y maduración completa hacia neuronas, deben existir en el entorno celular un conjunto de señales cualitativa y cuantitativamente adecuado, que permita la activación de esos procesos de una manera adecuada.

Recientemente, se han publicado diversos trabajos de revisión en los que se refieren no solo los estímulos que de una u otra forma intervienen en alguno de estos procesos celulares, sino que establecen las variaciones ontológicas en los mismos, revelando que hay unos factores específicos de la etapa embrionaria otros de la etapa fetal, otros específicos de la etapa adulta y otro conjunto de factores comunes a varias etapas (Lathia et al. 2007; Ninkovic and Götz 2002; Alvarez-Buylla and Lim 2004; Kazanis et al. 2008).



Alvarez-Buylla and Lim 2004

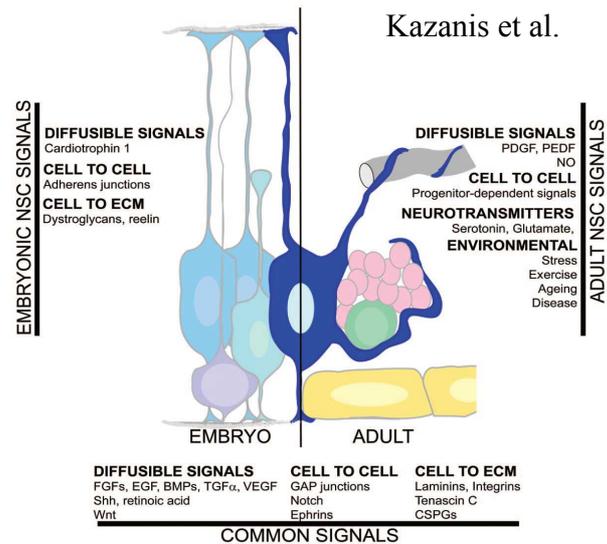
Estos estudios plantean que estas variaciones podrían explicar el diferente grado de actividad neurogénica en las distintas fases de la vida de los mamíferos adultos, al tiempo que sugieren que de alguna forma las células progenitoras conservan su capacidad de respuesta a los estímulos y son éstos los que varían en el entorno celular a lo largo de la vida del individuo. El esquema adjunto recoge en la mayoría de los factores conocidos en la actualidad y su evolución ontogénica. Como puede apreciarse, en la génesis del microambiente del nicho neurogénico intervienen muchos factores, no solamente factores difusibles, sino que también juegan un papel relevante las señales transmitidas por contacto celular o por contacto con la matriz extracelular. Por otra parte, el microambiente del nicho es algo cambiante a lo largo de la vida del individuo y también es modificado por determinadas condiciones ambientales y patológicas como la isquemia (Johanson et al. 2010; Kazanis et al. 2010; Vukovic et al. 2011).

Todos los comentarios previos nos permiten dibujar un entorno celular denominado “nicho neurogénico”, concepto que es considerado de gran relevancia en el momento actual. Este Nicho Celular incluye el conjunto de células, tanto precursoras y sus derivadas, como el resto de células del entorno (especialmente vasculares), junto con la matriz extracelular existente entre ellas y con el conjunto de señales e interacciones que se establecen entre los diversos tipos celulares. Este entorno o nicho celular, que es variable según momentos y circunstancias, sería realmente el factor que determina la actividad neurogénica a partir de las células Madre, tanto del cerebro embrionario como del adulto.

4) El CSF es un componente clave del “nicho neurogénico”.

Un hecho que se mantiene a lo largo de la vida del individuo y que pasa generalmente desapercibido es la relación de contacto entre las células progenitoras y el contenido de la cavidad cerebral. En la actualidad existen numerosos trabajos que demuestran la influencia del contenido de las cavidades cerebrales sobre el comportamiento de las células progenitoras por lo que el CSF ha pasado a ser considerado un componente importante del nicho neurogénico. Es llamativo que en el cerebro, las células progenitoras capaces de replicarse y generar neuronas, están en

contacto directo con la cavidad cerebral. De hecho en el Neuroepitelio embrionario todas estas células lo están (Gato and Desmond 2009), más tarde la glía radial se caracteriza por conservar a través de su extremo apical, contacto con el CSF y finalmente los precursores quiescentes o células B en el nicho de la zona subventricular del cerebro adulto se caracterizan por emitir una prolongación citoplasmática que atraviesa la capa de células endimarias y contacta con la cavidad del ventrículo donde emite un cilio corto que ha sido definido como una especie de antena receptora de señales (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).



Esta coincidencia de proximidad física CSF-Progenitores Neurales no es casual y existen numerosos estudios que demuestran que el CSF ejerce una influencia clave en el comportamiento de los precursores del sistema nervioso central (Götz and Shirke 2006; Mashayekhi et al 2009; Lhetinen et al. 2011). En este sentido nuestro grupo ha demostrado que el CSF embrionario juega un papel fundamental en la activación de la replicación (mediada por FGF-2) y la neurogénesis (mediada por Ácido Retinoico) de los precursores neuroepiteliales (Gato et al 2005-2009; Martín et al 2006; Alonso et al 2011). Igualmente, existen estudios (Miyani et al. 2003) que demuestran que el CSF en el periodo fetal ejerce una potente influencia mitogénica y neurogénica sobre los precursores durante el desarrollo cortical. Finalmente, hay otros trabajos (Sawamoto et al. 2006) que indican que el CSF del ventrículo lateral de ratones adultos, gracias a un gradiente de moléculas quimiorepulsivas, dirige el proceso de emigración de los precursores de la zona subventricular hacia el bulbo olfatorio. En este mismo sentido y de forma paradójica, se ha demostrado que el CSF induce proliferación y gliogénesis en las células progenitoras del hipocampo de humanos adultos (BuddensieK et al. 2010).

Estos datos demuestran que el CSF ejerce acciones diversas sobre los progenitores neurales en distintos momentos de la evolución ontogénica. Este hecho es comprensible si tenemos en cuenta que además de evolucionar la célula progenitora



durante la ontogénesis del individuo, también evoluciona la composición del CSF y por tanto sus propiedades, que varían considerablemente de la fase embrionaria temprana a la fase del adulto e incluso pueden variar entre el CSF de distintas cavidades cerebrales.

En cualquier caso estos datos demuestran que el CSF debe ser considerado como un elemento imprescindible del nicho neurogénico que ejerce una influencia decisiva en el comportamiento de sus componentes celulares.

HIPÓTESIS DE TRABAJO:

La activación de la neurogénesis a partir de células progenitoras del cerebro de mamíferos adultos abre una expectativa terapéutica en el campo de la neuroregeneración que requiere un control del proceso de neurogénesis y maduración funcional a partir de los Precursores Neurales. La evolución ontogénica de la composición y propiedades del “Nicho Neurogénico” conduce a una neurogénesis muy limitada en el adulto, que puede ser debida a una carencia de estímulos neurogénicos. El CSF es un factor clave en la determinación del nivel de actividad del nicho neurogénico y también sufre una modificación ontogénica perdiendo su capacidad de inducción neurogénica.

En este trabajo planteamos utilizar el CSF embrionario de ratón (periodo en el que posee la máxima capacidad neurogénica) como elemento activador de la neurogénesis a partir de Progenitores Neurales, en la zona subventricular de cerebro de ratones adultos, tratando de valorar y cuantificar en qué medida dicha activación reproduce un proceso de neurogénesis fisiológico que incluya la maduración neuronal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Con objeto de conseguir nuestro objetivo de demostrar la influencia del CSF embrionario (CSF-E) en el comportamiento de los precursores neuronales de cerebro adulto, hemos desarrollado inicialmente una estrategia experimental basada en el aislamiento y cultivo in vitro de dichos precursores neuronales indiferenciados, en medio de cultivo definido y en presencia o ausencia de CSF-E, valorando el nivel de activación de la replicación y diferenciación celular. Para ello nos hemos basado en una tecnología comercial desarrollada por la marca Miltenyi Biotech, que básicamente consiste en el aislamiento de un tipo celular concreto del tejido nervioso de cerebro de ratones adultos, mediante inmunomagnetismo (utilizando un anticuerpo marcado con partículas de hierro, frente a un antígeno específico de un tipo celular, y un sistema magnético de retención). El protocolo pormenorizado de esta técnica, así como las condiciones experimentales desarrolladas, se describen a continuación.

1.-Preparación del cultivo

Al tratarse de un cultivo celular de duración media, se realiza en un laboratorio con las condiciones adecuadas de esterilidad (limpieza de superficies con alcohol, oscuridad, exposición periódica a radiación ultravioleta, uso de guantes y material estéril etc.). Todas las operaciones se realizan en campana de flujo laminar, se emplean soluciones y medios de cultivo estériles y el material de microcirugía se autoclava y se conserva estéril en bolsas de celofán selladas.



2.- Estabulación, anestesia y apareamiento de los animales de laboratorio

Hemos empleado ratones adultos de la raza Swiss-webster, estabulados durante 2 meses en condiciones óptimas de humedad y temperatura, con una dieta equilibrada, sometidos a ciclos alternantes de luz/oscuridad y en ausencia de estímulos estresantes.

En nuestro estudio hemos empleado indistintamente machos y hembras de aproximadamente 3 meses de edad.

Tanto el manejo como la anestesia de los animales han sido realizados por personal cualificado y siguiendo la normativa vigente respecto a animales de experimentación (RD 1201/2005 de 10 de octubre, Ley 32/2007 de 7 de noviembre). La anestesia de



los ratones se realizó por inyección intraperitoneal de una mezcla de Ketamina (150 mgr/Kg de peso)/Xylacina (10 mgr/Kgr de peso) que proporciona una anestesia profunda y duradera, comprobada por ausencia de reflejo corneal. Inmediatamente antes de la obtención del cerebro o de los embriones en su caso, los animales anestesiados fueron sacrificados por decapitación.

Para la obtención de embriones se emplearon ratonas jóvenes en edad fértil, que fueron introducidas en la jaula de un macho joven en proporción 3/1, a las 20 h. y se las dejó durante la noche. A las 9 h. de la mañana siguiente, se procedió a la detección del tapón mucoso vaginal como signo de preñez, contándose el tiempo de desarrollo embrionario a partir de las 0 horas de ese día. Las hembras preñadas se mantienen en jaulas separadas hasta el momento adecuado del desarrollo embrionario.

3.- Obtención de CSF de embriones de ratón



Una vez transcurridos 12,5 días desde la determinación de la preñez, las ratonas fueron anestesiadas como se describe previamente y tras realizar una amplia laparotomía abdominal, se extrae quirúrgicamente el útero y se aíslan los embriones liberándoles de las membranas extraembrionarias. Los embriones se sitúan

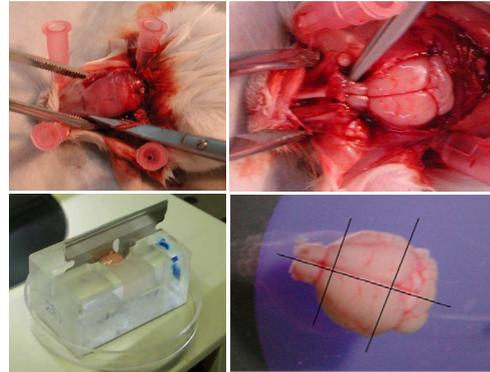


sobre una placa de Petri estéril y con ayuda de un micromanipulador, se inserta una micropipeta de vidrio (30-40 μm de diámetro interno) en la cavidad rombencefálica y se procede a la aspiración de CSF, evitando en todo momento la contaminación del mismo por células de la pared neuroepitelial. Para evitar la posible degradación proteica, el CSF obtenido de distintos embriones se va acumulando en un eppendorf a 4°C e inmediatamente se liofiliza y se almacena a -40 °C hasta su uso.

4.- Obtención del tejido cerebral

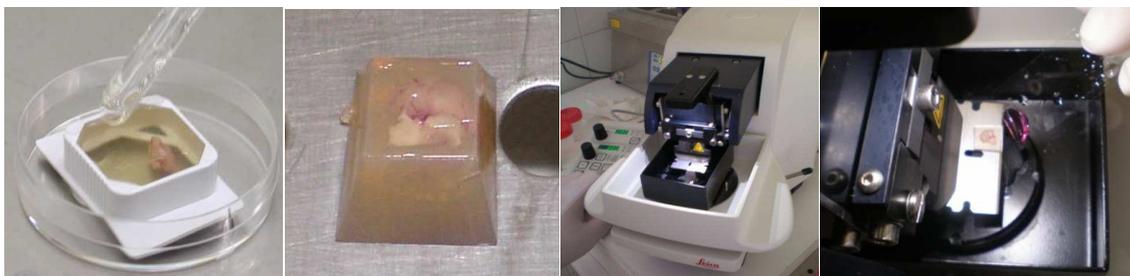
Hemos empleado ratones de las características previamente comentadas, anestesiados como ya hemos descrito, de los que se extrajo el encéfalo de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Tras ser rasurada y desinfectada con alcohol la región correspondiente a la bóveda craneal, se

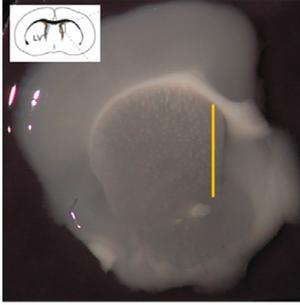


procede al sacrificio del animal por decapitación. A partir de este momento se trabaja en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Inicialmente se realiza una incisión longitudinal en la línea media de la piel de la cabeza del animal, que tras ser rechazada lateralmente deja al descubierto la bóveda craneal que a su vez es abierta en la línea media, desde el agujero occipital hasta la región nasal del animal. Las dos mitades de la bóveda craneal son levantadas con cuidado, exponiéndose el encéfalo. Tras seccionar el bulbo olfatorio, el tronco del encéfalo y los nervios craneales, el encéfalo es extraído y lavado con suero salino estéril a 4°C.

Posteriormente se procede a eliminar quirúrgicamente, el bulbo con el extremo anterior del encéfalo y el cerebelo para, finalmente, hacer una sección sagital media y separar ambos hemisferios cerebrales. Cada hemisferio es introducido en vertical en un molde que contiene una solución de agarosa al 3% mantenida en estado líquido a 56°C, que se deja enfriar y solidificar durante 1,5 horas a 4 °C.



Este molde de agarosa se talla y se fija en un micrótopo Leika VT 1200 con el que se obtienen secciones seriadas de 400 μ m de grosor de la zona subventricular correspondiente a la mitad anterior del ventrículo lateral.



En cada una de las secciones se obtiene la zona subventricular mediante sección quirúrgica de una banda de aproximadamente 2 mm de grosor, a lo largo de la pared lateral del ventrículo lateral. Estas piezas de tejido son recolectadas en un eppendorf y pesadas para evitar que sobrepasen los 400 mg (que es el límite de tejido recomendado por el fabricante para el proceso de disgregación celular). Una vez ajustado el peso, se transfieren las tiras de tejido a una placa Petri y se cortan en pequeños fragmentos.

5.- Disgregación tisular de la zona subventricular

A partir de este punto y en el resto del protocolo, el material y aparataje empleado provienen de la marca *Miltenyi Biotec-MACS*, asimismo todos los protocolos se ajustan a las descripciones del fabricante.

El procedimiento de disgregación tisular debe ser lo suficientemente intenso para liberar y exponer las células, pero lo suficientemente suave como para mantener la integridad antigénica de la superficie celular y su viabilidad en cultivo. Por ello hemos seguido el protocolo del “*Neural tube Dissociation Kit*” de la marca comentada que se basa en ciclos alternantes de digestión enzimática (Tripsina) y de disociación mecánica programada. El protocolo seguido se resume a continuación:

- Los fragmentos obtenidos de la zona subventricular (400 mg de tejido), se transfieren a un Tubo de disgregación (tipo C) que contiene 1950 μ l del *Enzyme Mix 1* (200 μ l solución 1 + 1750 μ l solución 2 preparada con 2.36 μ l β -Mercaptoetanol 50 mM) precalentado a 37°C durante 15'. El tubo se coloca en el *gentle MACS Dissociator* activando el programa m_brain_01. Se incuba el tubo C a 37°C durante 20 minutos en el horno de hibridación (37°C y velocidad 9 rpm). Se coloca de nuevo el tubo C en el gentle MACS Dissociator y se aplica el programa m_brain_02. Se prepara 30 μ l de *Enzyme Mix 2* (20 μ l de la Solución 3 + 10 μ l de la Solución *Enzyme Mix 4*) y se incuba el tubo C durante 15 minutos en el horno de hibridación. Se coloca el tubo en

el gentle MACS Dissociator y se aplica el programa m_brain_03. Se finaliza con una nueva incubación de 15 minutos en el horno de hibridación.

- El último paso consiste, en la eliminación de los restos de tejido y posibles agregados celulares. Para ello se realiza una centrifugación de 2 minutos a 300 g y tras resuspender las células en HBSS se pasan por un *Pre-Separation Filter* de 50 μm de diámetro de poro. Finalmente se centrifuga la suspensión celular durante 10' a 500 g., tras aspirar el sobrenadante completamente, se resuspenden en 70 μl de Buffer PBS-BSA-EDTA y se mantienen a 4°C.

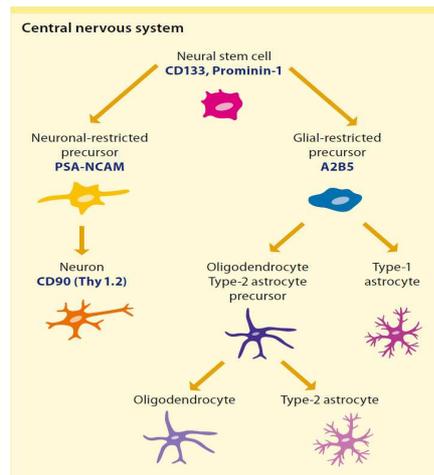
Soluciones empleadas:

- HBSS (w/o): Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) without Ca^{2+} and Mg^{2+} : disolver en 1 litro de dH_2O estéril.
- HBSS (w): Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) with Ca^{2+} and Mg^{2+} : disolver en 1 litro de dH_2O estéril.
- β -Mercaptoetanol (50 mM).
- Solución Enzime Mix 1: Alícuotas de 200 μl . congeladas a -20°C
- Solución Enzime Mix 2: Añadir β -Mercaptoetanol a una concentración final de 0.067 mM. A 1,75 ml de solución 2 añadirle 2.36 μl de 50 mM de β -Mercaptoetanol.
- Solución 4: resuspender en 0.7 ml del "Storage Buffer for Solution 4". No agitar, mezclar con cuidado, filtrar, hacer alícuotas de 10 μl y guardar a -20°C

6.- Inmunoselección de precursores neuronales indiferenciados de la ZSV

Como hemos comentado al principio de este capítulo, la base de esta técnica está en la inmunodetección de determinado tipo celular con anticuerpos específicos ligados a partículas de hierro, de forma que las células marcadas puedan ser retenidas mediante un campo magnético potente.

Dada la importancia de cultivar solo células precursoras neuronales indiferenciadas, hemos seguido las recomendaciones del proveedor comercial y hemos realizado este proceso en dos pasos, una primera inmunoselección (con Ac A2B5) ha sido realizada para eliminar del pool celular a los precursores gliales y después se ha realizado una segunda fase de inmunoselección (con Ac anti PSA-NCAM) para separar los precursores neuronales del resto de las células del tejido nervioso (células endimarias, glia, neuronas adultas, células madre, etc.). A continuación resumiremos el protocolo seguido:



- **Paso 1: Inmunoselección de precursores gliales con Ac A2B5**

Esta parte del protocolo debe de hacerse rápidamente, manteniendo las células en frío y utilizando las soluciones frías.

Las células resuspendidas en el buffer PBS/BSA/EDTA se incuban durante 10 min a 4°C. Se añaden 20 µl del **Anti A2B5 MicroBeads** y se incuba durante 15 min. Se lavan las células con 1 ml. del buffer PBS/BSA/EDTA. y se centrifugan 10 min. a 500g para finalmente resuspenderlas en 500µl del buffer PBS/BSA/EDTA.

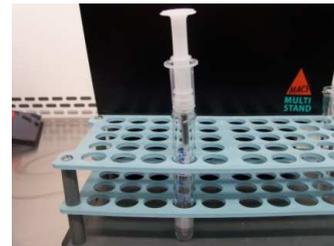


Tras situar correctamente en la base metálica la **MACS columna** con el imán y poner debajo un tubo de 10 ml, se añaden a la columna 500 µl del buffer PBS/BSA/EDTA y se deja que filtre por gravedad. Se añade la suspensión celular a la columna y se dejar eluir completamente por gravedad. Se lava la columna 3 veces con el buffer PBS/BSA/EDTA. Y se retira el tubo con la suspensión celular eluida (que contiene todos los tipos celulares excepto los precursores gliales) y se centrifuga 10 min. a 500g., al tiempo que la columna con los precursores gliales es desechada.

- ***Paso 2: Inmunoselección de precursores neuronales con Ac Anti PSA-NCAM.***

Al igual que la anterior, esta parte del protocolo ha de hacerse rápidamente manteniendo las células y utilizando soluciones a 4°C. La fracción eluida en el paso anterior (sin precursores gliales), se resuspende en 70µl del buffer PBS/BSA/EDTA y se mantiene durante 10 min a 4°C. Se añaden 20 µl del *Anti PSA-NCAM MicroBeads* y se incuban durante 15 min. Se lavan las células añadiendo 1 ml del buffer PBS/BSA/EDTA. Y se centrifugan 10 min. a 500g para finalmente resuspenderlas en 500µl del buffer PBS/BSA/EDTA.

A partir de este punto se procede de igual forma que en el paso anterior, es decir, se sitúa la columna MACS con el imán en la base metálica y se pone debajo un tubo de 10 ml. Se añade a la columna 500 µl del buffer PBS/BSA/EDTA y se deja que filtre por gravedad. Se añade la suspensión celular a la columna y se deja eluir por gravedad completamente. Se lava 3 veces con el buffer PBS/BSA/EDTA. Y se desecha la parte eluida (con todas las células excepto los precursores neuronales).



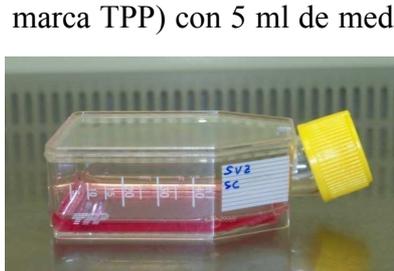
Se retira el imán de la columna y se hace pasar a presión con un embolo, 1 ml del buffer PBS/BSA/EDTA para eluir las células atrapadas. La porción eluida (Precursores Neuronales Indiferenciados), se traspasa a un tubo eppendorf, se centrifuga 10min. a 500g. y se resuspende en 1 ml de medio para realizar un conteo de la densidad celular con un hemocitómetro y proceder a la siembra celular en flaks de cultivo.

7.- Cultivo “in vitro” de precursores neuronales de la ZSV: Condiciones experimentales

Con objeto de comprobar la eficacia de proceso de aislamiento de la población de precursores neuronales, llegado este punto se separan una pequeña muestra de células sobre las que se hace un inmunomarcaje con Ac anti PSA-NCAM para ver si las células a cultivar son mayoritariamente precursores neuronales indiferenciados y se

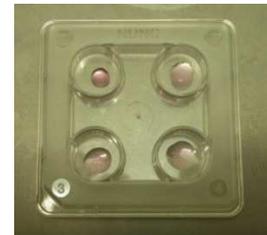
mantienen en estado indiferenciado. En otra pequeña muestra se hace un inmunomarcaje con Ac secundario frente al Ac antiPSA-NCAM para ver si las células conservan el Anticuerpo empleado en el marcaje inicial (unido a partículas de hierro).

Las células obtenidas con el protocolo anterior son sembradas en un Flask de cultivo celular (de 25 cm² de superficie y tapón permeable al medio gaseoso, de la



marca TPP) con 5 ml de medio de cultivo que contiene factores de crecimiento (véase preparación del método de cultivo) y son cultivadas durante 5 días a 38°C y 5% de CO₂, con objeto de expandir la población de precursores neuronales indiferenciados. Durante este periodo de cultivo se añaden factores de crecimiento cada dos días. Al término de este periodo inicial de cultivo, las células están en suspensión por lo que se centrifuga el medio de cultivo (15 min. 800g), se retira el sobrenadante y el precipitado celular se resuspende en 500µl de medio sin factores. Se cuentan en un hemocitómetro, y se calcula la cantidad de suspensión necesaria para sembrar en gota 5000 células por pocillo.

Para realizar la parte experimental del cultivo, se deposita un gota de 30µl (con un contenido de 5.000 células) sobre un cubre de cristal cubierto de poli-D-lisina y Laminina, para favorecer la adherencia celular y se introduce en un pocillo de cultivo que se cultiva en las condiciones descritas previamente durante 48 h.



Este medio de cultivo, está libre de factores de crecimiento y lleva incorporada BrdU (10 µM) para determinar la proliferación celular. Transcurridas las 48 horas de cultivo, se retira el medio y se fijan las células en Paraformaldehído tamponado al 4 % durante 30 min. a temperatura ambiente. Tras realizar varios lavados, se procede a la valoración de la tipología y grado de maduración celular mediante inmunocitoquímica.

Condiciones Experimentales

Con la técnica anteriormente descrita, hemos realizado un total de 6 cultivos diferentes que nos han permitido generar las distintas condiciones experimentales:

- Medio (Control).
- Medio + CSF-E al 10%.
- Medio + CSF-E al 20%
- Medio + CSF-E al 30%.

Preparación del Medio de Cultivo

Preparación previa de material:

- F12: 10.6 g en 1 litro de dH₂O. , filtrar.
- Glucosa 30%: 30g en 100 ml de dH₂O. mezclar y filtrar.
- 0.2% Heparina: 20 mg en 10 ml de dH₂O. mezclar y filtrar.
- Selenito sódico 3 mM: 10 mg en 19.3 ml de dH₂O.
- Progesterona 2 mM: 10 mg en 15.9 ml de EtOH 95%.
- Apo-Transferrina (100mg/ml): 500mg en 5 ml de DMEM/F12.
- Insulina (5.54 mg/ml): disolver 100 mg en 4 ml de HCl 0.1 N. Añadir a la mezcla 18 ml de dH₂O.
- Putrescina (1.93 mg/ml): 38.6 mg en 20 ml de dH₂O., mezclar.
- Laminina (1mg/ml).
- Poli-D-Lisina (1mg/ml)

Preparación del 10x hormone mix (100 ml):

- 85ml DMEM/F12 (1:1): Disolver 450.5 mg F12 en 42.5 ml de dH₂O. Filtrar. Mezclar la solución F12 con 42.5 ml de DMEM.
- 2.4 ml glucosa 25% ó 2 ml glucosa 30%.
 - 1.5 ml NaHCO₃ 7.5%.
 - 0.5 ml HEPES 1M.
 - 1 ml Apo-Transferrina.
 - 5.5 ml Insulina.



- 5 ml putrescina.
- 10 μ l progesterina 2 Mm.
- 10 μ l selenito sódico 3 mM.

Preparación del medio de cultivo (100 ml):

- 85 ml DMEM/F12 (1:1).
- 2.4 ml glucosa 25% ó 2 ml glucosa 30%.
- 1.5 ml NaHCO₃ 7.5%
- 0.5 ml HEPES 1M
- 1 ml glutamina
- 10 ml 10X Hormone Mix
- 0.2 ml heparina 0.2%
- 1 ml penicilina/Streptomicina
- 20 ng/ml EGF (sol. trabajo: 10 ng/ml) y/o 10 ng/ml FGF-2 (sol. trabajo: 100 ng/ml).

8.- Determinación inmunocitoquímica del tipo y grado de maduración celular.

Procedimiento general

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

- Lavado con Tris-HCl pH 7.4
- Se añade HCl 2N precalentado a 37°C. Se trata durante 30 minutos a 37°C.
- Se lava con dH₂O.
- Se lava con Tris-HCl pH 7,4.
- Se añade ácido bórico *ácido bórico (0.1M a pH 8.5)* durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se lava con dH₂O 10'



- Se lava con Tris-HCl pH 7.4.
- Se bloquea con TST (Tris-HCl + 1% SBF + 1% Tritón X-100) durante 8 minutos.
- Se diluyen los anticuerpos primarios en TST.
- Se incuban con el Anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche.
- Se lava con TST.
- Se diluyen los anticuerpos secundarios en TST.
- Se incuban con los Anticuerpos secundarios a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1 hora.
- Se lava con Tris-HCl pH7.4.
- Se lava con dH₂O.
- Se monta con medio acuoso y se sella.

Anticuerpos primarios y secundarios empleados en el estudio inmunocitoquímico:

- **Anti BrdU:** Hecho en ratón (Dako. Ref.: M7240), dilución 1/50. **Secundario:** Antimouse Ig G-Alexa 488 (Invitrogen. Ref.: 10680), Dilución 1/1000. Ocasionalmente se usó Alexa 594 (Invitrogen. Ref.: A11005) Dilución 1/1000.

- **Anti Sox2 (D-17):** Hecho en cabra (Santa Cruz Biotechnology. Ref.: sc-17319), dilución 1/50. **Secundario:** Antigoat Ig G-Alexa 594. (Invitrogen. Ref.: A11058), Dilución 1/1000.

- **Anti β -III-Tubulina.** Hecho en conejo (SIGMA. Ref.: T2200), dilución 1/20. **Secundario:** Antirabbit IgG-Alexa 488 (Invitrogen. Ref.: A11008), dilución 1/1000.

- **Anti DCX (Doblecortina):** Hecho en conejo (Abcam. Ref.: ab18723), Dilución 1/1000 → Secundario Antirabbit Ig G-Alexa 488 (Invitrogen. Ref.: A11008), dilución 1/1000.

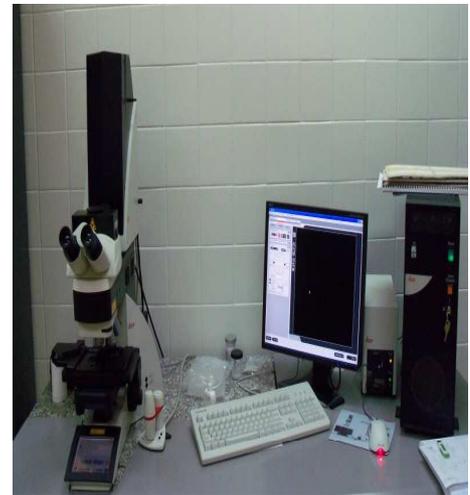
- **Anti PSA-NCAM:** Hecho en ratón (Chemicon ref: MAB 5324), dilución 1/200. **Secundario:** Anti mouse IgM- Alexa 568 (Invitrogen ref A21043) dilución 1/1000.

Con objeto de asegurar la especificidad de los resultados, en todos los casos se incluyó un control negativo en el que el anticuerpo primario fue inactivado por calor.

Todos los inmunomarcajes fueron visualizados con un microscopio “Leica TCS SPE confocal laser microscope” equipado con un láser de estado sólido, con un filtro de excitación espectral y con un objetivo de 40X en seco.

9.- Valoración de los resultados

Sobre las imágenes obtenidas con el microscopio laser confocal, se realizó una magnificación para obtener campos de $0'0269 \text{ mm}^2$, sobre los que se contaron las células marcadas con un anticuerpo o las que presentaban doble marcaje. En todas las condiciones experimentales se emplearon 20 campos de cultivos diferentes para la obtención de datos. Para el análisis de los datos hemos empleado la media +/- la desviación estándar y la significatividad estadística se midió mediante una T de Student de doble cola.



RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados obtenidos en la fase experimental. Distinguimos dos etapas, una primera orientada a la expansión de células precursoras neurales no diferenciadas, ya que la población de precursores de la que disponemos no es muy elevada. La replicación de las mismas se valora con el marcaje “BrdU” y el estado de diferenciación mediante la expresión de “Sox-2”.

En la segunda etapa, la cual se ha desarrollado a partir de las células obtenidas en la etapa de expansión (1ª etapa), valoramos el efecto de la aplicación de fluido cerebroespinal embrionario (CSF-E), mediante marcaje con “BrdU”, sobre la replicación celular y el marcaje con “ β -3 tubulina”, marcador de diferenciación neural temprano, que nos indica existencia de células diferenciándose a neuronas.

1ª Fase experimental: Expansión de población de células precursoras

En la primera fase, en la que se pretende expandir la población de precursores neurales, obtenidas en base al protocolo descrito previamente, sin activar su diferenciación, procedemos a cultivar células precursoras neurales, añadiéndoles factores mitogénicos, como son FGF-2 y EGF. El cultivo se prolongó durante un período de 5 días, como se detalla en el apartado de material y métodos

Tras ese período, comprobamos si se ha producido el incremento del número de precursores neuronales sin diferenciación. Empleamos un inmunomarcaje con BrdU que nos va a marcar los núcleos de los precursores neurales y las células que obtengamos de su replicación, marcándose con color verde (imagen 1). Además, conjuntamente, utilizamos un anticuerpo anti Sox-2, el cual es un marcador de indiferenciación celular que distingue a los precursores neurales no diferenciados aún, y se apreciará en color rojo (imagen1).

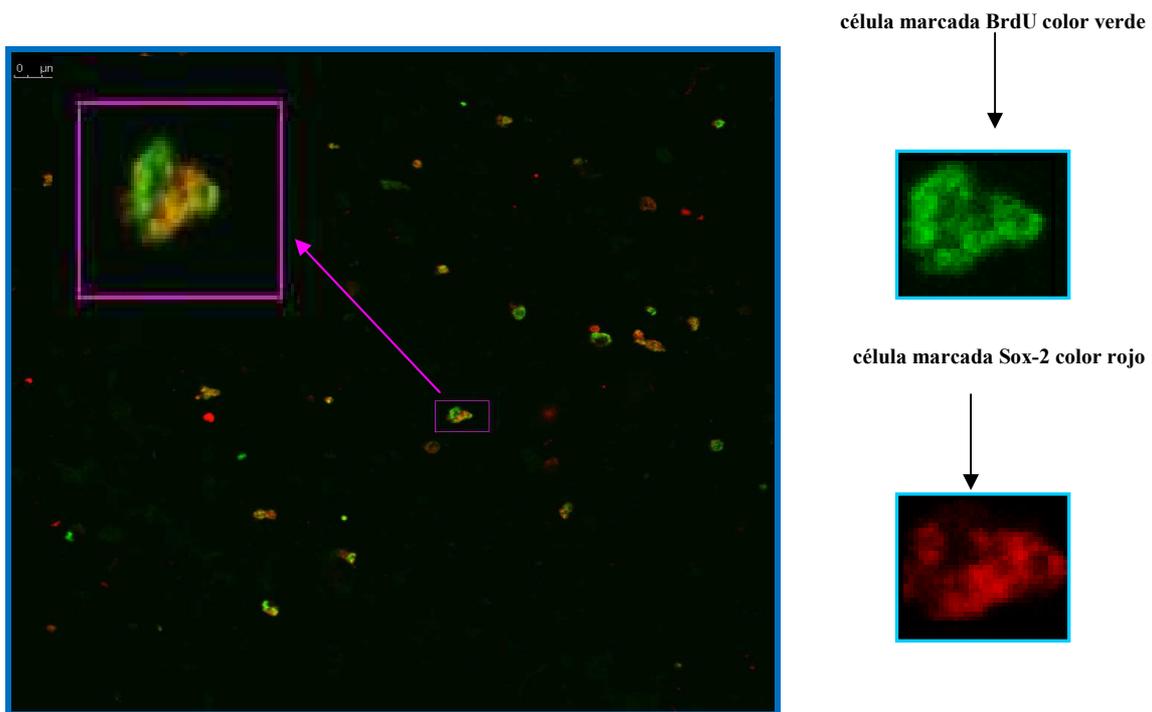


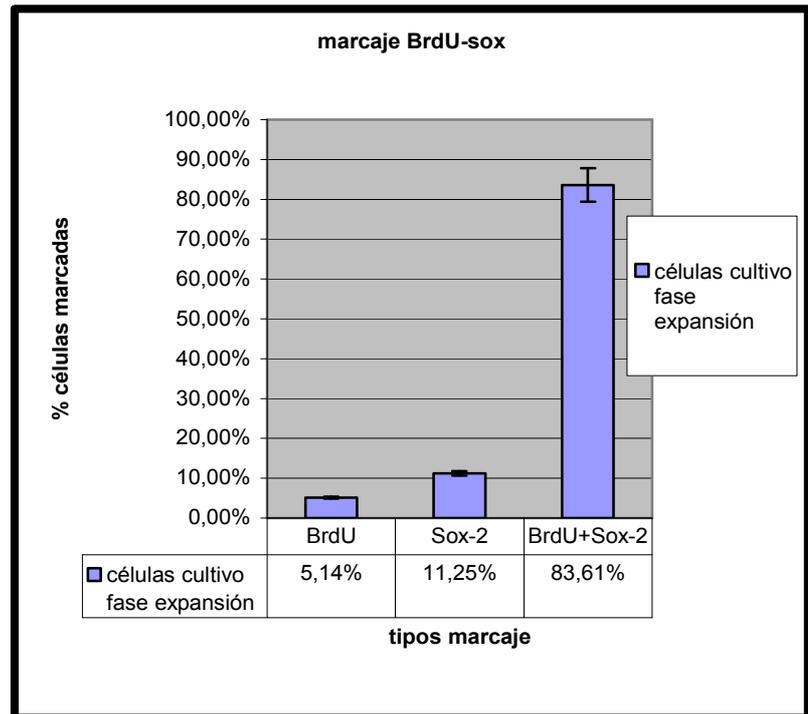
Imagen 1: Ejemplo de célula con marcaje conjunto BrdU+Sox-2

El primer hecho a valorar es la apreciación de la expansión celular, ya que el recuento de células al inicio del cultivo era 5,75 células/campo, y al final del mismo, 36,6 células/campo. Lo cual supone un incremento del **531%** tras los 5 días de cultivo.

Como se observa en la gráfica 1, al final del cultivo, se aprecia un importante porcentaje (83,61%) de células que se marcan conjuntamente, tanto con BrdU como con Sox-2, lo cual muestra que se trata de precursores neurales indiferenciados, o neuroblastos. Además, en estos resultados también apreciamos células que únicamente se marcan con BrdU (5,14%) y que no expresan Sox-2, indicándonos, que son células precursores con alta capacidad de replicación. El porcentaje de células que sólo expresan Sox-2 es de un 11,25%.

Los datos obtenidos nos indican que la población celular se ha expandido hasta un número significativo de células y además, en su mayoría se mantienen como precursores neurales indiferenciados por el grado de maduración logrado.

Gráfico1: muestra el porcentaje de células que se marcan con BrdU y Sox-2, conjuntamente y separado.



Media ± Desviación estándar			
	BrdU	Sox	BrdU+sox
Experimental	2,06 ± 1,24	4,4 ± 1,74	33,06 ± 10,7

2ª Fase experimental: Efecto del CSF-E

Como se establece en la fase anterior, disponemos de un porcentaje significativo de precursores neurales indiferenciados, esto es, neuroblastos, frente a un porcentaje menor de células que son precursores con elevada capacidad de replicación.

De forma natural, la evolución de estas células, que son precursores neurales, o neuroblastos, sería, su diferenciación, a neuronas jóvenes. Este hecho lo podemos valorar mediante la presencia de β -3 tubulina en el citoplasma, marcador de diferenciación celular neural temprano.

En esta 2ª fase o fase experimental, al cultivo de células de precursores neurales, obtenidos en la fase de expansión, sin los factores mitogénicos mencionados en la fase experimental anterior (FGF-2 y EGF), se le añade CSF-E, a diferentes concentraciones, procediendo a mantener el cultivo 48 horas y en las condiciones descritas en el apartado de material y métodos. Establecemos un cultivo control al que no se le añade CSF-E.

Al final del periodo de cultivo, realizamos un doble marcaje con Ac BrdU y Ac β -3 tubulina. Observamos células sólo marcadas con BrdU, esto es, precursores indiferenciados que no han pasado a convertirse en neuronas jóvenes, cuyo porcentaje es pequeño (6%) y células que coexpresan, en el núcleo, BrdU y β -3 tubulina en el citoplasma, esto es, neuronas jóvenes. Una mayor o menor expresión de β -3 tubulina nos indicará si son neuronas jóvenes totalmente diferenciadas o recién diferenciadas, respectivamente.

A continuación, se muestran imágenes del cultivo control (A) y experimental con CSF-E (B), donde apreciamos células con ambos marcajes: BrdU (color rojo) y β -3 tubulina (color verde), siendo este marcaje combinado más significativo en número.

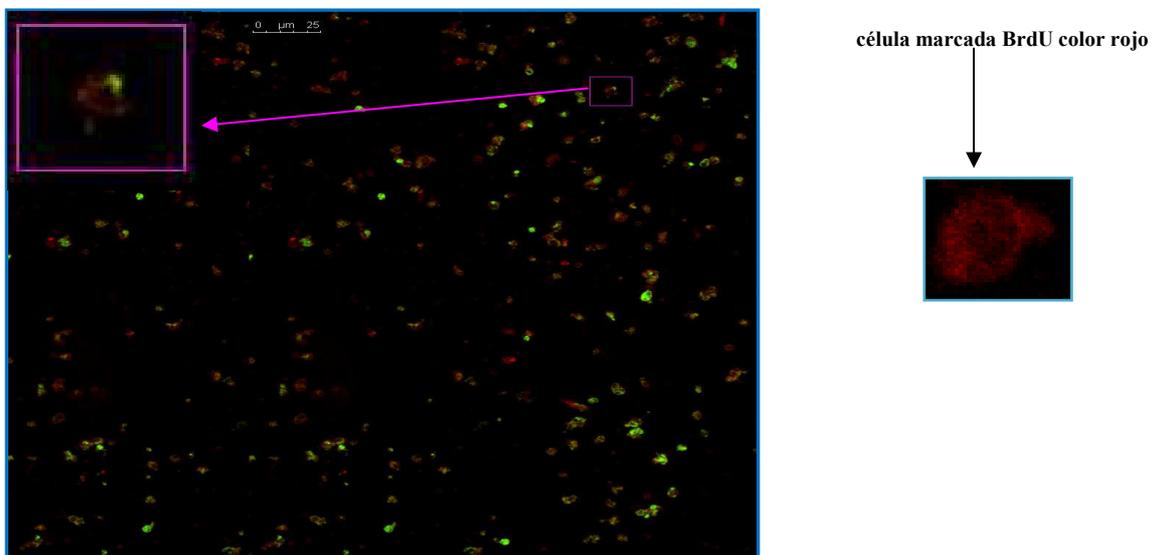


Imagen A. Ejemplo de imagen del cultivo **control** donde se ven células marcadas con BrdU y β 3 tubulina.

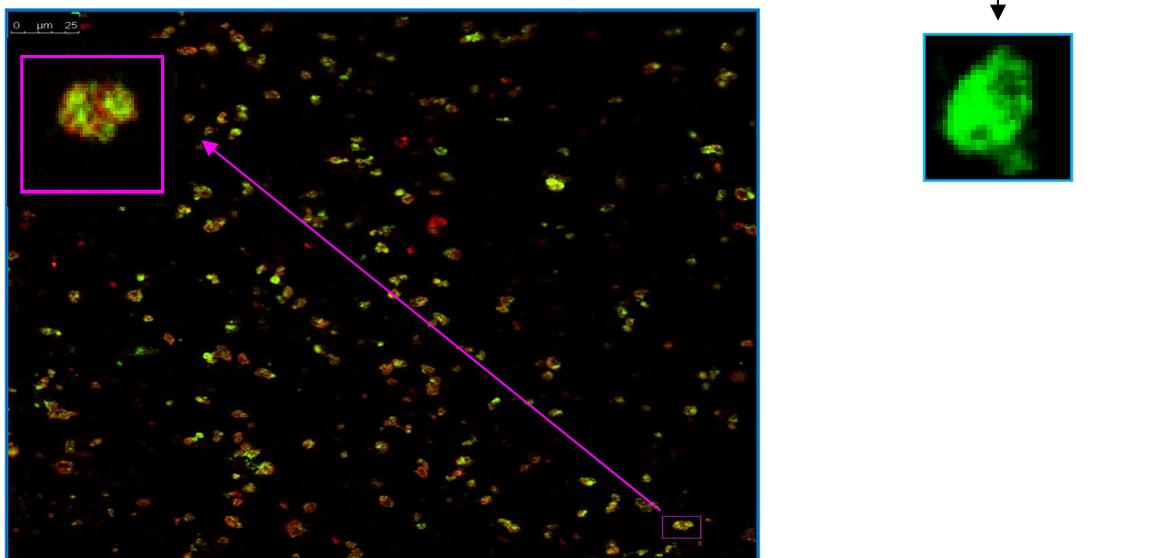
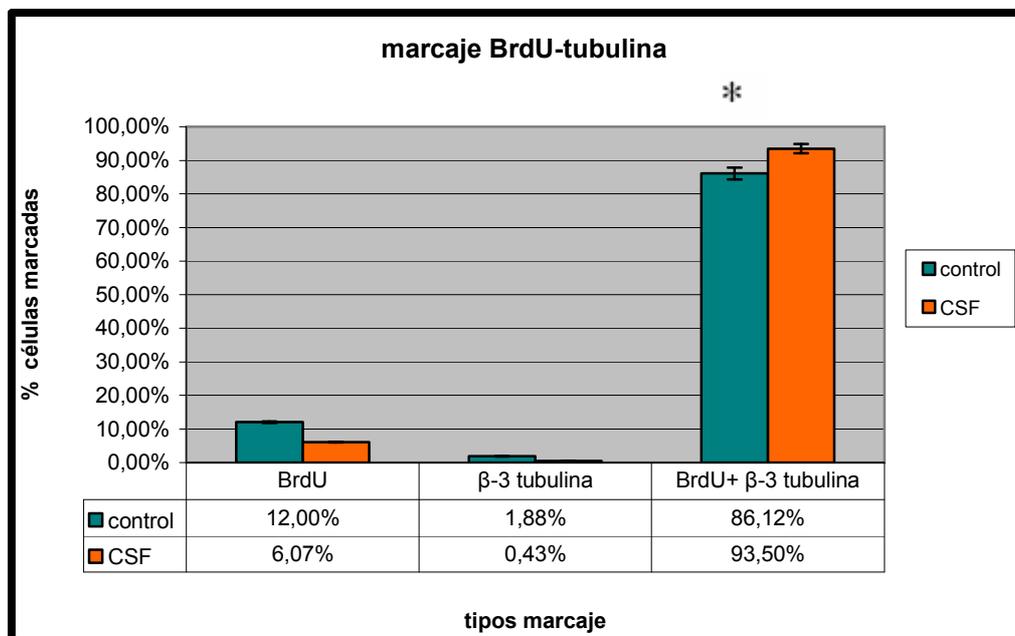


Imagen B. Ejemplo de imagen del cultivo **experimental** donde se ven células marcadas con BrdU y β 3 tubulina.

Seguidamente, mostramos los resultados obtenidos tras ese periodo de cultivo en la gráfica 2. Cabe destacar que el porcentaje total de células que expresan BrdU y β -3 tubulina es elevado y las células que sólo son BrdU positivas aparecen en menor número.

La expresión del comarcaje, BrdU y β -3 tubulina, en el cultivo control comparado con el cultivo expuesto a la acción del CSF-E, muestra que hay un incremento del porcentaje total de células en el cultivo con CSF-E, frente al cultivo control, por el efecto mitogénico del CSF-E (7%), porcentaje no muy elevado, pero estadísticamente significativo

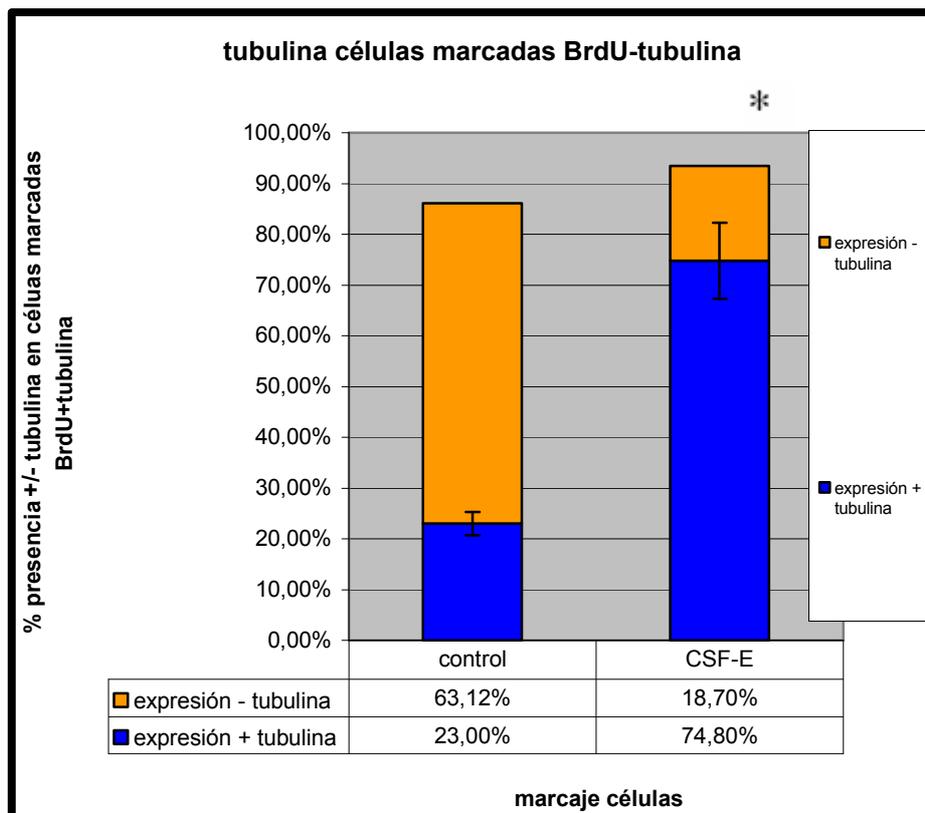


Media \pm Desviación estándar			
cultivo	BrdU	β -3 tubulina	BrdU+ β -3 tubulina
Control	5,83 \pm 2,82	0,91 \pm 3,18	42 \pm 16,31
CSF	7,07 \pm 4,08	0,54 \pm 0,66	108,78 \pm 34,22

* $p > 0,05$

Gráfico 2: muestra la relación de células que expresan, en los grupos control y experimental (con CSF-E), BrdU sólo, β -3 tubulina sólo y ambos de forma conjunta.

El porcentaje de células que expresan BrdU y β -3 tubulina en el cultivo con CSF-E (93,50%), no es claramente superior al del cultivo control (86,12%). Pero si valoramos el grado de maduración neural mediante la cantidad de expresión de β -3 tubulina (ver imágenes 2 y 3), apreciamos que en el cultivo con CSF-E, el porcentaje de células que expresan de forma más intensa β -3 tubulina es significativamente mayor que en el cultivo control, (casi un **52%**), como se muestra en el gráfico 3.



Media \pm Desviación estándar		
	Expresión + β -3 tubulina	Expresión - β -3 tubulina
control	11,16 \pm 5,32	30,83 \pm 12,42
CSF	87 \pm 27,48	24,72 \pm 7,26

* $p > 0,05$

Gráfico 3. Representa cantidad de β -3 tubulina (+ ó -) expresada, tanto en el grupo control como el grupo con CSF-E, en células que se marcan conjuntamente con BrdU y β -3 tubulina.

Esta mayor expresión de β -3 tubulina o una expresión más intensa, lo vemos en las imágenes siguientes (2 y 3), donde la expresión de β -3 tubulina es más marcada en el cultivo con CSF-E frente al cultivo control

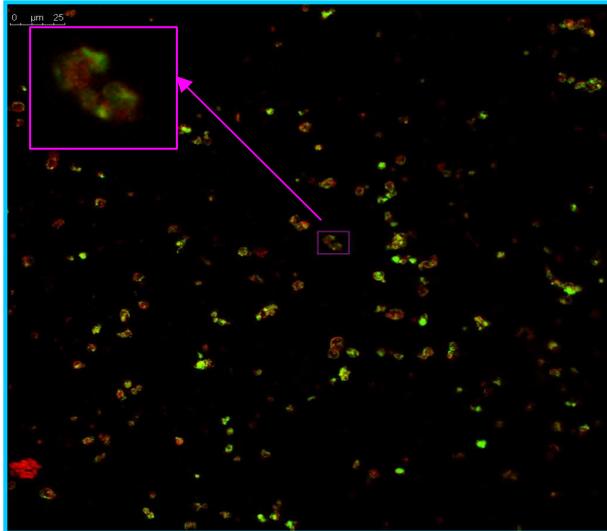


Imagen 2: cultivo control donde se aprecia menor expresión, menos intensa de β -3 tubulina

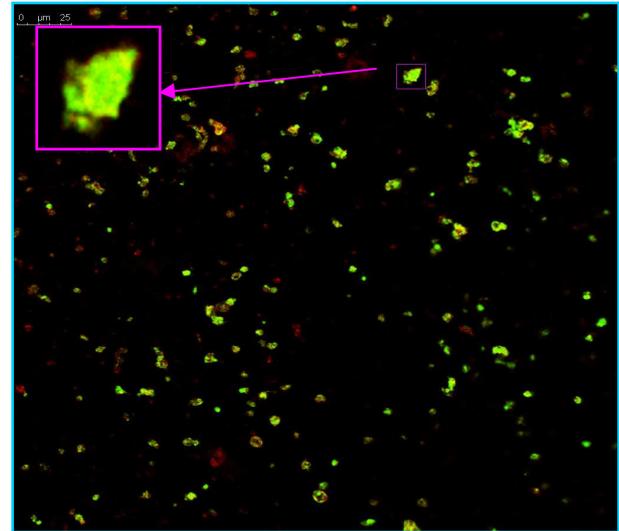


Imagen 3: cultivo con CSF-E en el que las células tienen una expresión más intensa de β -3 tubulina

Estas observaciones nos indican que el CSF-E induce cambios significativos en la población de precursores celulares del sistema nervioso central de mamíferos adultos. Por lo que el CSF-E al actuar sobre poblaciones de precursores neurales indiferenciados, incrementa, claramente, el paso de neuroblastos a neurona joven, poniendo de manifiesto su capacidad neurogénica sobre células progenitoras del cerebro de mamíferos adultos.

Estos resultados nos muestran que:

- Tras el cultivo de expansión, al quitar los factores mitogénicos, las células tienden a iniciar la diferenciación neural (bajo expresión de β -3 tubulina).
- El CSF-E ejerce una influencia en el comportamiento de estas células, incrementando en un 7%, de forma significativa, estos precursores neurogénicos.
- La activación neurogénica por el CSF-E es mucho más evidente si valoramos el grado de maduración neural que es mucho mayor en las células expuestas a este fluido.

CONCLUSIONES

Este trabajo experimental pone de relevancia que, la capacidad del fluido cerebroespinal embrionario (CSF-E) para inducir neurogénesis en precursores neurales embrionarios, se mantiene también cuando actúa sobre precursores neurales del cerebro adulto de ratón. Por lo que el CSF-E influye en el comportamiento de precursores neuroepiteliales, activando, además de la neurogénesis, la mitosis, expandiendo así la población de precursores.

Conocemos, sobradamente, que el CSF-E tiene propiedades mecánicas e hidrostáticas, implicadas en la expansión del sistema nervioso central en el período embrionario. La presión positiva del CSF-E es un factor clave en la formación de las cavidades encefálicas primitivas, de las que se forman las estructuras que darán lugar a los espacios por los cuales fluye el líquido cefalorraquídeo en el adulto, de tal forma que el CSF-E influye en la expansión y morfogénesis cerebral.

Nuestro trabajo demuestra que el CSF-E es capaz de activar la neurogénesis de precursores de cerebro adulto en ratón, debido, entre otras cosas, a que los factores neurogénicos del CSF-E son estables ontogénicamente. Además, esos factores embrionarios del CSF-E son capaces de inducir una respuesta a las células progenitoras del cerebro adulto.

Por otro lado, la capacidad neurogénica en el cerebro adulto está limitada en condiciones normales. No obstante, el CSF-E supone el componente clave del “nicho neurogénico” (concepto ya explicado en el apartado Introducción de este trabajo), por el cual se crea el microambiente ideal que modifica esas condiciones, pudiendo inducir capacidad neurogénica.

Los factores neurogénicos del CSF-E no son totalmente conocidos, sin embargo, sabemos que el ácido retinoico juega un importante papel. Futuros estudios determinarán si el ácido retinoico es un elemento clave en la neurogénesis del cerebro adulto.



Finalmente, los datos aportados en este trabajo permiten establecer estrategias dirigidas a la génesis neuronal, a partir de poblaciones de precursores endógenos en células adultas, con las consiguientes aplicaciones múltiples que ello conlleva, concretamente en el campo de la neuroregeneración.



BIBLIOGRAFÍA

- Alonso MI, Martín C, Carnicero E, Bueno D, Gato A. Cerebrospinal fluid control of neurogenesis induced by retinoic acid during early brain development. *Dev Dyn.* 2011 Jul;240(7):1650-9.
- Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci.* 2002 Feb 1;22(3):629-34.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron.* 2004 Mar 4;41(5):683-6.
- Arias-Carrión O, Olivares-Buñuelos T, Drucker-Colín R. [Neurogenesis in the adult brain]. *Rev Neurol.* 2007 May 1-15;44(9):541-50.
- Brazel CY, Rao MS. Aging and neuronal replacement. *Ageing Res Rev.* 2004 Nov;3(4):465-83.
- Buddensiek J, Dressel A, Kowalski M, Runge U, Schroeder H, Hermann A, Kirsch M, Storch A, Sabolek M. Cerebrospinal fluid promotes survival and astroglial differentiation of adult human neural progenitor cells but inhibits proliferation and neuronal differentiation. *BMC Neurosci.* 2010 Apr 8;11:48.
- Bull ND, Bartlett PF. The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. *J Neurosci.* 2005 Nov 23;25(47):10815-21.
- Cai C, Thorne J, Grabel L. Hedgehog serves as a mitogen and survival factor during embryonic stem cell neurogenesis. *Stem Cells.* 2008 May;26(5):1097-108.
- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999 Jun 11;97(6):703-16.
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 28;96(20):11619-24.



- Gato A, Desmond ME. Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent regulators of embryonic brain growth, morphogenesis and histogenesis. *Dev Biol.* 2009 Mar 15;327(2):263-72.
- Gato A, Martín P, Alonso MI, Martín C, Pulgar MA, Moro JA. Analysis of cerebrospinal fluid protein composition in early developmental stages in chick embryos. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2004 Apr 1;301(4):280-9.
- Gato A, Moro JA, Alonso MI, Bueno D, De La Mano A, Martín C. Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2005 May;284(1):475-84.
- Gato, A. and Desmond, M.E. Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent regulators of embryonic brain growth, morphogenesis and histogenesis. *Dev. Bio.* 2009; 327: 363-272.
- Georg Kuhn H, Blomgren K. Developmental dysregulation of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 2011 Mar;33(6):1115-22.
- Gilbert SF. *Developmental Biology*. 8^{ed}. 2006. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Götz M, Stricker SH. Go with the flow: signaling from the ventricle directs neuroblast migration. *Nat Neurosci.* 2006 Apr;9(4):470-2.
- Johansson PA, Cappello S, Götz M. Stem cells niches during development--lessons from the cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol.* 2010 Aug;20(4):400-7.
- Kaneko N, Kako E, Sawamoto K. Prospects and limitations of using endogenous neural stem cells for brain regeneration. *Genes.* 2011. 2:107-130.
- Kaneko N, Sawamoto K. Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions. *Neurosci Res.* 2009 Mar;63(3):155-64.



- Kazanis I, Lathia J, Moss L, French-Constant C. The neural stem cell microenvironment. 2008 Aug 31. StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute.
- Kazanis I, Lathia JD, Vadakkan TJ, Raborn E, Wan R, Mughal MR, Eckley DM, Sasaki T, Patton B, Mattson MP, Hirschi KK, Dickinson ME, French-Constant C. Quiescence and activation of stem and precursor cell populations in the subependymal zone of the mammalian brain are associated with distinct cellular and extracellular matrix signals. *J Neurosci*. 2010 Jul 21;30(29):9771-81.
- Kernie SG, Parent JM. Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis*. 2010 Feb;37(2):267-74.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*. 2009;32:149-84.
- Kuhn HG, Blomgren K. Developmental dysregulation of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2011 Mar;33(6):1115-22.
- Laskowski A, Schmidt W, Dinkel K, Martínez-Sánchez M, Reymann KG. bFGF and EGF modulate trauma-induced proliferation and neurogenesis in juvenile organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res*. 2005 Mar 10;1037(1-2):78-89.
- Lathia JD, Rao MS, Mattson MP, French-Constant C. The microenvironment of the embryonic neural stem cell: lessons from adult niches? *Dev Dyn*. 2007 Dec;236(12):3267-82.
- Lehtinen MK, Zappaterra MW, Chen X, Yang YJ, Hill AD, Lun M, Maynard T, Gonzalez D, Kim S, Ye P, D'Ercole AJ, Wong ET, LaMantia AS, Walsh CA. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron*. 2011 Mar 10;69(5):893-905.
- Liu H, Guthrie KM. Neuronal replacement in the injured olfactory bulb. *Exp Neurol*. 2011 Apr;228(2):270-82.



- Maia J, Santos T, Aday S, Agasse F, Cortes L, Malva JO, Bernardino L, Ferreira L. Controlling the neuronal differentiation of stem cells by the intracellular delivery of retinoic acid-loaded nanoparticles. *ACS Nano*. 2011 Jan 25;5(1):97-106.
- Martin, C., Bueno, D., Alonso, M. I., Moro, J. A., Callejo, S., Parada, C., Martin, P., Carnicero, E., and Gato, A. FGF2 plays a key role in embryonic cerebrospinal fluid trophic properties over chick embryo neuroepithelial stem cells. *Dev. Biol.* 2006; 297: 402-416.
- Mashayekhi F, Azari M, Moghadam LM, Yazdankhah M, Naji M, Salehi Z. Changes in cerebrospinal fluid nerve growth factor levels during chick embryonic development. *J Clin Neurosci*. 2009 Oct;16(10):1334-7.
- Merkle FT, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol*. 2006 Dec;18(6):704-9.
- Mingaud F, Mormede C, Etchamendy N, Mons N, Niedergang B, Wietrzych M, Pallet V, Jaffard R, Krezel W, Higuieret P, Marighetto A. Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. *J Neurosci*. 2008 Jan 2;28(1):279-91.
- Miyan JA, Nabiyouni M, Zendah M. Development of the brain: a vital role for cerebrospinal fluid. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003 Apr;81(4):317-28.
- Miyan JA, Zendah M, Mashayekhi F, Owen-Lynch PJ. Cerebrospinal fluid supports viability and proliferation of cortical cells in vitro, mirroring in vivo development. *Cerebrospinal Fluid Res*. 2006 Mar 20;3:2.
- Morshead CM, Craig CG, van der Kooy D. In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain. *Development*. 1998 Jun;125(12):2251-61.
- Ninkovic J, Götz M. Signaling in adult neurogenesis: from stem cell niche to neuronal networks. *Curr Opin Neurobiol*. 2007 Jun;17(3):338-44.



- Okano H, Sakaguchi M, Ohki K, Suzuki N, Sawamoto K. Regeneration of the central nervous system using endogenous repair mechanisms. *J Neurochem.* 2007 Sep;102(5):1459-65.
- Okano H, Sawamoto K. Neural stem cells: involvement in adult neurogenesis and CNS repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008 Jun 27;363(1500):2111-22.
- Parada C, Gato A, Bueno D. All-trans retinol and retinol-binding protein from embryonic cerebrospinal fluid exhibit dynamic behaviour during early central nervous system development. *Neuroreport.* 2008 Jun 11;19(9):945-50.
- Parada C, Parvas M, Bueno D. Cerebrospinal fluid proteomes: from neural development to neurodegenerative diseases. 2007. *Curr. Proteomics*, 4: 89-106.
- Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, Romero-Rodriguez R, Berger MS, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol.* 2006 Jan 20;494(3):415-34.
- Rodríguez JJ, Verkhratsky A. Neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Anat.* 2011 Jul;219(1):78-89.
- Sanes, Dan H. Reh, Thomas A. *El desarrollo del sistema nervioso.* Ed. Ariel 2002.
- Sawamoto K, Hirota Y, Alfaro-Cervello C, Soriano-Navarro M, He X, Hayakawa-Yano Y, Yamada M, Hikishima K, Tabata H, Iwanami A, Nakajima K, Toyama Y, Itoh T, Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Okano H. Cellular composition and organization of the subventricular zone and rostral migratory stream in the adult and neonatal common marmoset brain. *J Comp Neurol.* 2011 Mar 1;519(4):690-713.
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla A. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science.* 2006 Feb 3;311(5761):629-32.



- Urbán N, Martín-Ibáñez R, Herranz C, Esgleas M, Crespo E, Pardo M, Crespo-Enríquez I, Méndez-Gómez HR, Waclaw R, Chatzi C, Alvarez S, Alvarez R, Duester G, Campbell K, de Lera AR, Vicario-Abejón C, Martínez S, Alberch J, Canals JM. Nolz1 promotes striatal neurogenesis through the regulation of retinoic acid signaling. *Neural Dev.* 2010 Aug 24;5:21.
- Vukovic J, Blackmore DG, Jhaveri D, Bartlett PF. Activation of neural precursors in the adult neurogenic niches. *Neurochem Int.* 2011 Sep;59(3):341-6.
- Yamashita T, Ninomiya M, Hernández Acosta P, García-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H, Sawamoto K. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci.* 2006 Jun 14;26(24):6627-36.
- Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M. Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. *Neuropharmacology.* 2008 Sep;55(3):345-52.
- Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.* 2008 Feb 22;132(4):645-60.