



Aspectos técnicos del estudio de la neurogénesis post-natal

Rodrigo Andrade, Federico Arismendi, Juan Pablo Bandeira

José Gabriel Barceló, Santiago Curbelo

Orientadoras: Dra. Milka Radmilovich y Dra. María E. Castelló

Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la
República

Departamento de Neurociencias Integrativas y Computacionales, Instituto de
investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura.

Índice	Pág.
Carátula	1
Índice	2
Resumen	3
Palabras clave	3
Reseña histórica	4
Neurogénesis en el cerebro adulto de mamíferos	5
Zona subventricular	6
Zona subgranular del giro dentado del hipocampo	6
Factores que regulan la neurogénesis post-natal	7
Particularidades de la neurogénesis en amniotas	7
Técnicas de estudio de la neurogénesis postnatal	8
Técnica de Golgi	8
Técnica autorradiográfica basada en la marcación con timidina tritiada de células en fase S del ciclo celular.	9
Estructura de la timidina tritiada	11
Mecanismo de acción de la timidina tritiada	11
Metabolismo de la timidina tritiada en seres humanos	11
Ventajas y desventajas de la timidina tritiada para el estudio de la neurogénesis postnatal	12
Técnica de marcación de células en fase S del ciclo celular con Bromodeoxiuridina (BrdU).	13
Ventajas y desventajas	13
Modo de administración, metabolismo y biodisponibilidad en el SNC	14
Dosis	14
Otros análogos de la timidina	15
Utilización de virus para el estudio de la neurogénesis post-natal	17
Mecanismos de acción	18
Limitaciones para su uso	19
Resonancia nuclear magnética	20
Aplicaciones de las técnicas en el campo de la medicina	22
Conclusiones	23
Bibliografía	25
Anexos	32

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión sistemática sobre las distintas técnicas utilizadas en el estudio de la neurogénesis post-natal. En la primera mitad del siglo XX la arquitectura neural era concebida como algo fijo, inmutable. Este dogma se cuestionó a principios de los años 60, momento en que los hallazgos de Joseph Altman, utilizando las técnicas autorradiográficas de marcación con timidina tritiada (H^3 -timidina), evidenciaron por primera vez la generación de nuevas neuronas en la vida adulta. En el afán de consolidar los nuevos conceptos, y debido a las desventajas que traía consigo el uso de H^3 -timidina, se hizo necesaria la incorporación de nuevas técnicas de marcado de células en fase S del ciclo celular en el sistema nervioso central. En este contexto, hacia la década del 80, se introduce la Bromodeoxiuridina (BrdU), la cual llegó a convertirse en el marcador de células proliferantes más utilizado en esta área de estudio, a pesar de que su uso no se encontraba exento de dificultades. Los avances técnicos en torno a este campo de la neurobiología no cesaron. Así, en la década de los 90 se posibilitó el estudio de linajes celulares por la utilización de marcadores virales. Pese a sus aportes, esta nueva técnica, también tuvo una aplicabilidad discutida por el posible riesgo biológico que implicaba su utilización en humanos. Finalmente, en los últimos años se desarrollaron técnicas imagenológicas no invasivas, como la resonancia nuclear magnética, la cual aporta información importante en el estudio de la neurogénesis in vivo, incluso en humanos. Esta aproximación metodológica es particularmente interesante por las implicancias a futuro en su uso para el diagnóstico y el tratamiento de algunas patologías neurológicas.

Palabras clave: neurogénesis post-natal, timidina tritiada, bromodeoxiuridina, marcadores virales, resonancia nuclear magnética.

RESEÑA HISTÓRICA

Históricamente en la neurobiología se encontraba arraigado el concepto formulado por Santiago Ramón y Cajal (1914) (citado por ¹, p.56): “Preciso es reconocer que, en los centros adultos, las vías nerviosas son algo fijo, acabado, inmutable. Todo puede morir, nada puede renacer”. Como se explicita en el trabajo de Breunig², esto se contradice con descubrimientos del propio Ramón y Cajal quien utilizando la técnica de impregnación de Golgi había logrado visualizar la reparación del tejido neuronal postlesión² y también “había demostrado la capacidad regenerativa de los cabos axónicos seccionados”¹.

Dados los significativos avances, tanto técnicos como conceptuales, este dogma sostenido por la comunidad científica actualmente ha perdido su vigencia. El paso más importante en esta dirección fue dado a mediados de la década de 1960 por el científico estadounidense Joseph Altman. Según relata el propio Altman³ en el libro, Neurogenesis in the adult brain I, con el objetivo de realizar “un mapeo de las diferencias regionales en el metabolismo proteico del cerebro”, llegó a utilizar la técnica autorradiográfica con timidina tritiada (H³-timidina) con la que, basándose en la visualización de neuronas marcadas en sitios no esperados, llegó a proponer la posibilidad de la generación de nuevas neuronas en el cerebro adulto. Esto lo motivó a realizar posteriores estudios con los que confirmó la neurogénesis en el cerebro adulto. Para esto inyectó H³-timidina intraperitonealmente a ratas, visualizando luego en “autorradiogramas un número variable de células gliales marcadas a lo largo del cerebro y de la medula espinal, y una alta concentración de células marcadas en la capa subependimial en el techo del cuerno anterior del ventrículo lateral”.

Según refieren Gage y Van Praag⁴: “A mediados de 1970 y principios de 1980, Michael Kaplan reexaminó estas observaciones iniciales utilizando la microscopía electrónica y añadió evidencia sustancial de que no solo la neurogénesis podría ocurrir en el cerebro adulto, sino que también las células que aparecen son estructuralmente similares a células hermanas en el giro dentado del hipocampo”.

Como se puede ver en los trabajos de Gage Van Praag⁴ y Gil Perotín et al⁵, fue en la misma década de 1980 cuando Fernando Nottebohm y su alumno Steve Goldman, en el marco de su estudio “Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of

the adult female canary brain”, demostraron la presencia de neurogénesis en centros telencefálicos de los canarios relacionados con el aprendizaje vocal.

A pesar de todos estos hallazgos, el concepto de la neurogénesis post-natal no fue asimilado por la comunidad científica hasta fines de la década de los 1990. Según los mismos autores⁵, fue en 1998 cuando Gould et al, gracias a la aparición de nuevas técnicas, descubren la presencia de neurogénesis en regiones asociativas de primates. Simultáneamente a estos hallazgos, un grupo de investigadores encabezado por Eriksson (1998) (citado por ¹, p.60) utilizó BrdU con fines terapéuticos. Se trataba de enfermos aquejados de carcinomas espino-celulares que estaban ubicados en la base de la lengua, la faringe o la laringe. Dichos pacientes recibieron una dosis mínima y única de BrdU con el fin de evaluar la actividad proliferativa del tumor. Luego de esto el tejido cerebral se extrajo post-mortem y se evidenció una mayor captación en las zonas en las que se especulaba que podía haber neurogénesis. Esto fue un punto de inflexión en el cual la temática de la neurogénesis postnatal adquiere la relevancia que tiene actualmente, tanto desde el punto de vista científico como clínico.

En la década de 1980 aparece la técnica basada en marcación con vectores virales, con el fin de complementar las técnicas de marcación de fase S. Los vectores virales otorgan la posibilidad de estudiar los distintos linajes celulares pudiendo así determinar los orígenes y destino de las nuevas neuronas.

La última técnica que ha adquirido relevancia en esta área de estudio es la resonancia nuclear magnética, que otorga la posibilidad de estudiar in vivo la proliferación celular y el destino de las nuevas células de un modo no invasivo, incluso en humano.

NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO DE MAMÍFEROS

La neurogénesis se define como el “proceso que incluye división celular, migración y diferenciación”⁴, “generando neuronas funcionales a partir de precursores neuronales a lo largo de toda la vida en áreas restringidas del cerebro”⁶.

Los científicos Potten y Loeffler (1990) (citados por ⁷, p.754) han postulado que “las nuevas células neuronales se originan a partir de células madre residuales en el cerebro adulto”. Como especifica Taupin⁷, fueron los científicos antes mencionados quienes han definido las 5 características que debe presentar una célula para ser considerada célula madre: “Proliferación,

auto-renovación a lo largo de un período extendido de tiempo, generación de un gran número de progenie diferenciada, mantenimiento de la homeostasis del tejido y regeneración del tejido seguida de la lesión”.

Según Arias-Carrión⁸, en la actualidad es posible especificar que las áreas con mayor actividad neurogénica en el cerebro de mamíferos adultos son la zona subventricular (ZSV) telencefálica y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo.

Zona subventricular telencefálica

En esta zona comienza el proceso de neurogénesis que culmina con la formación de nuevas interneuronas del bulbo olfatorio. Se ha logrado determinar gracias al estudio de la morfología, ultra-estructura, propiedades electrofisiológicas y marcadores específicos, que está compuesta por cuatro tipos celulares. Estos son: neuroblastos proliferativos o células tipo A, células astrocíticas de proliferación lenta o tipo B, células transitorias amplificadoras o tipo C y finalmente células endodiales ciliadas o tipo E⁸.

Como se puede apreciar en la figura 1, “se sabe que las células tipo B son las células precursoras de las nuevas neuronas y capaces de generar neuroesferas (agregado de células madre o células progenitoras neuronales)”⁸. “El modelo propone que las células tipo B dan origen a las células tipo C y éstas a las tipo A. Las células tipo A van a migrar una distancia considerable (alrededor de 5 mm en roedores y hasta 20 en primates) para alcanzar al bulbo olfatorio”⁸. Una vez allí, las nuevas neuronas se separan de las cadenas formadas por células tipo A y migran radialmente a las capas granular y periglomerular del bulbo olfatorio. En dichas capas se dará culminación al proceso de neurogénesis mediante la diferenciación en interneuronas gabaérgicas y dopaminérgicas. Dichas células “se integran en el circuito neuronal que es responsable del olfato y de la memoria olfatoria”⁹.

Zona subgranular del giro dentado del hipocampo

Esta zona dará origen a las células gliales y neuronas de la capa granular del giro dentado, cuyos axones se proyectan a la región CA3 del hipocampo. Al igual que en la SVZ se pueden observar distintos tipos celulares: astrocitos radiales (células B), células precursoras (células D) y finalmente nuevas neuronas granulares (células G)⁸. Los estudios sugieren que las

células B dan origen a las células D, y estas originan a su vez las nuevas neuronas granulares o células G⁸.

La función de estas nuevas neuronas se desconoce, pero se cree que pueden contribuir a los procesos de aprendizaje y memoria que radican en el hipocampo. Ciertos estudios indican que las neuronas del giro dentado proyectan a la región CA3, concluyendo que participan en la codificación de la información que será utilizada por esta zona^{7,8}.

Factores que regulan la neurogénesis post-natal

Existen diversos factores endógenos y/o exógenos que regulan la neurogénesis en el cerebro adulto de los mamíferos. Algunos la estimulan, mientras que otros la inhiben. A partir de los trabajos de Gage y Van Praag⁴, Taupin⁷ y Arias-Carrión et al.⁸ presentamos una síntesis esquemática en la Tabla 1.

PARTICULARIDADES DE LA NEUROGÉNESIS EN AMNIOTAS

A diferencia de lo que ocurre con el proceso de neurogénesis más restringido en el cerebro de los mamíferos adultos, diversos estudios han demostrado que el cerebro de los reptiles adultos continúa adicionando neuronas en múltiples regiones, entre ellas se han descrito el bulbo olfatorio, cerebro rostral, todas las áreas corticales, cresta ventricular dorsal anterior, septum, estriado, núcleo esférico y cerebelo¹⁰.

Los autores señalan la inexistencia de ZSV en el cerebro de reptiles y anfibios, un dato que es consistente con el argumento de que la ZSV en los mamíferos es la que contribuye a la expansión laminar del neocortex. En el caso de los pollos se ha descrito una ZSV que contribuiría con el 50% de las células migrantes¹⁰.

Estudios comparativos en diferentes especies se consideran importantes para comprender la formación de los surcos y los giros de la corteza cerebral y también para el entendimiento de las patologías neurológicas del humano¹¹.

Tres tipos principales de células se han descrito en la zona ventricular del cerebro de reptiles y aves, las migratorias (Tipo A), la glia radial (Tipo B) y las células ependimales (Tipo E) que poseen aspectos anatómicos y fisiológicos que se asemejan a los mismos tipos descritos

en mamíferos. Vale la pena destacar que no fueron halladas ni en reptiles ni en aves células asimilables a las células tipo C de la ZSV de mamíferos ¹².

Como resultado de experimentos en donde se indujeron lesiones en el telencéfalo de lagartos, se demostró su enorme potencial de regeneración neuronal, al punto que se evidenció su capacidad para regenerar largas porciones del telencéfalo, lo que motiva a investigadores a profundizar en este tema para plantear la posibilidad de nuevas estrategias terapéuticas en humanos.

TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA NEUROGÉNESIS POSTNATAL

Luego de analizados los importantes avances que hubo en el área de estudio de la neurogénesis en el cerebro adulto, realizaremos una revisión de las diversas técnicas que han tenido trascendencia y relevancia en esta temática. Las técnicas que analizaremos son: técnicas histológicas clásicas (técnica de Golgi), técnicas autorradiográficas con marcación con H³-timidina, técnicas con marcación con BrdU y otros análogos de la timidina, técnicas basadas en la marcación con retrovirus y técnicas imagenológicas (resonancia nuclear magnética).

Técnica de Golgi

Camilo Golgi ideó uno de los métodos que permite la impregnación de células nerviosas y sus prolongaciones con la reacción de nitrato de plata y dicromato de potasio o sodio. Esta técnica ha recibido modificaciones, algunas hechas por el propio Golgi y otras realizadas por otros neurocientíficos, buscando adaptarla a las necesidades y exigencias de los problemas científicos abordados por los investigadores. Aún hoy se considera a esta técnica de utilidad para los estudios anátomo-funcionales del sistema nervioso ¹³.

Revisiones realizadas por investigadores postulan a la técnica como óptima para el estudio de neuronas integradas y destacan que su aplicación impulsó el estudio del sistema nervioso central en condiciones normales y patológicas ya que, al igual que todas las técnicas que han derivado de ella, en las que se lleva a cabo una fijación con sales dicrómicas o cromo dicrómicas seguida por la exposición a sales metálicas, permiten visualizar el cuerpo celular y sus prolongaciones axónicas y dendríticas ^{14,15}. Según relata Torres-Fernández¹⁴, las modificaciones a la técnica inicial realizadas por Gibb y Kolb ofrecen la ventaja de poder impregnar cerebros completos de pequeños animales, predecir resultados menos azarosos y

garantizar imágenes de buena calidad de las dendritas y sus espinas. Según Torres-Fernández¹⁴, la técnica de Golgi motivó al perfeccionamiento de métodos histológicos e hizo reconocer la necesidad de desarrollar microscopios que pudieran mostrar con fidelidad imágenes tridimensionales de las neuronas impregnadas y sus ramificaciones más finas. Es gracias a ello que Marvin Minsky patentó en el año 1957 el microscopio confocal. El mismo autor reconoce igualmente que poco se ha explotado la nueva herramienta en combinación con la técnica de Golgi para el estudio del sistema nervioso central.

Es importante resaltar que si bien la técnica de Golgi no es aplicada con la estricta finalidad del estudio de la neurogénesis post natal, ha sido fundamental para la descripción de las características morfológicas de las regiones donde esta ocurre, además de promover la invención de herramientas como la microscopía confocal que han sido de vital importancia para el avance y el desarrollo de los conocimientos en esta y otras áreas de investigación^{14,16}.

Técnica autorradiográfica basada en la marcación con timidina tritiada de células en fase S del ciclo celular.

Sin duda alguna, la marcación de células en fase S del ciclo celular con H³-timidina fue la técnica de estudio que marcó un punto de inflexión en la temática de la neurogénesis en el cerebro adulto de mamíferos. Como destacamos previamente, algunas técnicas histológicas habían arrojado indicios sobre la formación de nuevas neuronas en la etapa postnatal. Sin embargo, no fue hasta principios de la década del 1960, en que Altman y colaboradores³, utilizando la H³-timidina obtuvieron evidencia sustancial a favor de la neurogénesis en adultos. Es por su importancia histórica y por sus cualidades técnicas que nuestro grupo de trabajo decidió incluir esta técnica en esta revisión.

Este método de marcación fue desarrollado por Taylor, Woods y Hughes en el marco de su trabajo “The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine”¹⁷. Ellos tenían el objetivo de obtener información acerca de la “organización macromolecular de los cromosomas y su modo de duplicación”. En dicha publicación los investigadores hacen referencia al trabajo de Reichard y Estborn en el que utilizaron N¹⁵-timidina para la marcación del ADN, así como a los trabajos de Friedkin et al, y Downing y Schweiger que seleccionaron como método de marcación de síntesis del ADN a la C¹⁴-timidina. Sin embargo, ninguna de estas dos técnicas fue considerada

satisfactoria. Gracias a estos trabajos Taylor et al llegaron a la conclusión de que la timidina era el componente del ADN que debía ser marcado, dado que es un precursor del ADN pero no del ARN. Estos mismos escogieron el tritio como radioisótopo de unión a la timidina debido a que éste “debería proveer la mayor resolución obtenible, dado que sus partículas beta tienen un máximo de energía de solo 18 Kev, correspondiendo a un rango un poco mayor a un micrón en las emulsiones fotográficas”¹⁷. Para este trabajo utilizaron plántulas de *Vicia faba* ya que conocían las características de sus cromosomas, así como la duración de su ciclo celular y el tiempo de duración de la fase de síntesis de ADN. Primero plantaron las semillas de esta especie en un medio con una solución con H³-timidina durante 8 horas, y luego las trasladaron a un medio que contenía colchicina durante periodos de tiempos variables (10 o 34 horas). Por lo que encontraron células con 12, 24 o 48 cromosomas (Figs. 2 y 3). Estos investigadores pudieron ver “que la timidina unida al ADN de un cromosoma es parte de una entidad física que permanece intacta durante las replicaciones sucesivas y divisiones nucleares, excepto por un ocasional intercambio de cromátide”¹⁷.

El otro trabajo que nosotros consideramos importante mencionar es de Joseph Altman³ que llevó al planteo de la existencia de un proceso de neurogénesis en el cerebro adulto. Como bien mencionamos previamente, Altman “comenzó un trabajo exploratorio en el mapeo de las diferencias regionales en el metabolismo proteico del cerebro provocado por la estimulación visual y la actividad motora”. Luego de realizar estudios con glicina tritiada y leucina tritiada, Altman³ relata que se encontraba “perturbado por los hallazgos inconsistentes de metabolismo proteico incrementado con la activación motora pero no con la estimulación visual, y la relativa inespecificidad del uso de aminoácidos en las ratas ejercitadas y por la variabilidad individual en los animales”. Por esta razón, Altman se enfocó en el uso de la H³-timidina, la técnica de nuestro interés. Mediante este estudio, pudo observar que existía marcación de las neuronas en lugares no relacionados con su sitio de estudio, el cuerpo geniculado lateral. Para poder estudiar con mayor profundidad este nuevo hallazgo, Altman “inyectó H³-timidina intraperitoneal a ratas y gatos adultos. En las ratas, los autoradiogramas mostraban un número variable de células gliales marcadas a lo largo del cerebro y de la médula espinal y una alta concentración de células marcadas en la capa subependimal en el techo del cuerno anterior del ventrículo lateral. En adición, la marcación radioactiva estaba constantemente presente en células granulares en el giro dentado del hipocampo”³. Los autorradiogramas son mostrados en las

figuras 4 y 5. En los gatos también se vieron algunas neuronas corticales marcadas. El hallazgo de Altman en la corteza cerebral de gatos se muestra en la figura 6.

Estructura de la Timidina Tritiada

“El tritio es un isótopo radioactivo del hidrógeno, que emite radiación en forma de partículas beta. El tritio se unirá en los sitios en los cuáles lo hace el hidrógeno, incluyendo agua, y en tejido vegetal, animal y humano”¹⁸. Para sintetizar la H³-timidina, Taylor et al.¹⁷ realizaron “un intercambio catabólico del tritio por el grupo carboxilo del ácido acético unido a un átomo de carbono en el anillo pirimidínico de la timidina”. La estructura de la H³-timidina se puede apreciar en la Figura 7. La combinación de estas dos estructuras, el tritio y la timidina, le confiere a este marcador cualidades únicas. Como se dijo previamente, la timidina es utilizada para los procesos de síntesis de ADN y el tritio es un marcador que permite obtener imágenes autorradiográficas con la mayor nitidez posible.

Mecanismo de acción de la timidina tritiada

El mecanismo de acción de la H³-timidina explica en parte sus ventajas y sus desventajas para el estudio de la neurogénesis en el cerebro adulto, como será detallado más adelante. La H³-timidina tiene la capacidad de incorporarse al ADN celular durante la síntesis del mismo. Esto quiere decir que, siendo la duplicación del ADN un proceso semiconservativo, la H³-timidina se incorpora a la hebra naciente del ADN de las células que se encuentran en la fase S de su ciclo celular. Significando esto que para que la técnica logre marcar las neuronas que se encuentran en síntesis, la H³-timidina debe estar presente en el medio al momento de la fase S de las neuronas. La H³-timidina marcará las células que se encuentran en la fase S así como también a las células que resulten de la mitosis de estas.

Metabolismo de la timidina tritiada en seres humanos

Para evaluar el metabolismo de la H³-timidina nos basaremos en los trabajos de Rubini et al¹⁹ y de Straus et al²⁰. Ambos trabajos utilizaron metodologías similares: se inyectó H³-timidina por vía intravenosa a pacientes con enfermedades terminales y luego se obtuvieron muestras seriadas de sangre, orina, materia fecal y evaluación autorradiográfica de los tejidos para el primer estudio, y de plasma, orina, saliva y vapor de aire para el segundo estudio.

Así se pudo revelar que luego de la inyección intravenosa de H³-timidina la actividad de la misma en el plasma tiene 2 fases. Una primera, con una vida media de 4 minutos aproximadamente que se asociaba con la distribución de la H³-timidina en el agua corporal. Una vez alcanzado el equilibrio con el agua corporal, la H³-timidina en plasma tiene una vida media de 7 a 12 días¹⁹ o de 10,8 días²⁰. En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos por Rubini et al¹⁹.

En cuanto al metabolismo renal de la H³-timidina, Rubini et al.¹⁹ únicamente midieron la presencia de compuestos no volátiles en la orina durante las primeras 24 horas (fig. 9). Straus et al.²⁰ encontraron que “dentro de 2 a 3 minutos luego de la administración intravenosa de H³-timidina se detectó actividad de tritio en la orina”. Luego alcanzó una concentración 115 veces mayor a la plasmática. En promedio 54,2 ± 2,4% de la dosis total administrada fue excretada en la orina en los primeros 12 días y un 68% fue perdida en los primeros 60 días. Por tanto concluyen que “La mayoría de la dosis inyectada, entonces, se elimina por excreción renal”²⁰.

Estos estudios también demostraron que el líquido cefalorraquídeo, la saliva y el líquido pleural alcanzan concentraciones de H³-timidina similares a las del plasma. Esto se debe a la distribución de la H³-timidina en el agua corporal.

Otro dato muy valioso aportado por estos estudios es que “la incorporación de H³-timidina al ADN celular ocurre predominantemente en los primeros minutos post-inyección intravenosa y se completa esencialmente al final de la primer hora”²⁰. “Un máximo de 19,8% de la actividad inyectada se incorpora al ADN celular”²⁰. Con la muerte celular, la H³-timidina incorporada al ADN es eliminada como orina o por pérdidas insensibles.

Ventajas y desventajas de la timidina tritiada para el estudio de la neurogénesis postnatal

A pesar de ser la técnica que aportó la base para esta área de investigación, el advenimiento de nuevas técnicas, con mayor bioseguridad y de igual o mayor sensibilidad, desplazó el uso de la H³-timidina en el campo del estudio de la neurogénesis. Las ventajas y desventajas de esta técnica se enumeran en la Tabla 2.

Técnica de marcación de células en fase S del ciclo celular con Bromodeoxiuridina (BrdU).

Dadas las desventajas ya vistas para la utilización de la H³-timidina, se consideró necesaria la introducción de nuevos métodos en el estudio in situ de la proliferación celular en el SNC de mamíferos adultos. En este contexto, hacia la década del 80, se introduce la Bromodeoxiuridina (BrdU) ²⁵. El BrdU cobró relevancia en 1982 cuando Gratzner desarrolló el anticuerpo primario para el reconocimiento de dicho marcador. Sustituyó a la H³-timidina, al punto de convertirse en la técnica más utilizada. Dada la gran popularidad adquirida por esta técnica y por su utilidad en el estudio de la neurogénesis postnatal, consideramos importante incorporarla en nuestra revisión.

Ventajas y desventajas

Dentro de sus ventajas podemos mencionar su confiabilidad y rapidez de ejecución, que evita el manejo de materiales radioactivos y el menor coste en su procedimiento. El BrdU es una halopirimidina, que puede detectarse mediante inmunohistoquímica. Se integra a la cadena de ADN de las células, durante la fase S del ciclo celular. Es importante mencionar que el BrdU no es un marcador de replicación celular, sino que marca aquellas células que se encuentran en el proceso de síntesis del ADN, en la mencionada fase del ciclo ²⁵.

A pesar de ser una de las técnicas más utilizadas en la actualidad para estudiar la neurogénesis adulta in situ, debemos mencionar que no está exenta de limitaciones. El BrdU es una sustancia tóxica y mutagénica, que puede desencadenar la muerte celular, alterar la estabilidad del ADN, y alargar el ciclo celular. El BrdU no sólo se inserta en el ADN de las células en replicación, sino que también lo hace en el proceso de reparación.

Por otro lado, debemos mencionar que “el proceso de tinción no es estequiométrico y la intensidad o extensión de la reacción no refleja, necesariamente, la magnitud del proceso de replicación del ADN” ¹. Como se mencionó previamente, “el BrdU puede ser detectado mediante inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra el ADN monocatenario que contiene BrdU. El uso de anticuerpos primarios dirigidos contra éste, requiere la desnaturalización del ADN, mediante hidrólisis parcial del tejido con HCL” ²⁵. Es decir que, para poder exponer el epítipo al anticuerpo debe hidrolizarse previamente con un ácido fuerte, lo cual conspira contra una correcta preservación tisular ¹.

Modo de administración, metabolismo y biodisponibilidad de la Bromodeoxiuridina en el SNC:

Existen diversas vías de administración del BrdU, entre ellas se destacan las vías intracerebroventricular (ICV), técnica invasiva que se utiliza en casos en que se requieren altas concentraciones del mismo en el SNC; intraperitoneal (ip) e intravenosa (iv), métodos más utilizados en el estudio de la neurogénesis adulta; y la vía oral, preferida cuando las técnicas invasivas producen un nivel de stress capaz de alterar la tasa de neurogénesis. “El BrdU se metaboliza a través de deshalogenación cuando se integra en el ADN. Una vez deshalogenado, el residuo uracilo se escinde del ADN por el sistema de la reparación de uracilglicosilasa. También se metaboliza rápidamente mediante deshalogenación en el plasma (la vida media del BrdU en el plasma es de 8 a 11 minutos aproximadamente, en humanos)”²⁵.

El BrdU, al igual que la H³-timidina, atraviesa la barrera hematoencefálica mediante un sistema de transporte activo de nucleósidos de baja afinidad. La cantidad que alcanza el cerebro es solamente una fracción de la dosis administrada. Permanece disponible para el marcado de células en fase S durante 2 horas aproximadamente después de la inyección sistémica, luego de las cuales comienza a disminuir su concentración en el SNC. Se elimina de la circulación cerebral a través del LCR.

Dosis

Uno de los principales debates en torno al uso del BrdU como marcador de células nerviosas proliferantes en el SNC se produce por la dosis óptima administrada. Dosis bajas aseguran que los efectos tóxicos sobre las células alcanzadas sean mínimos o nulos, pero se corre el riesgo de no llegar a marcar una buena cantidad de células. El suministro de dosis altas asegura que la sustancia alcance a todas las células que están sintetizando ADN, pero trae consigo la desventaja de producir alteraciones significativas en la estabilidad del ADN de las células marcadas. De esta manera, aumenta la posibilidad de marcar células que no transcurrieron por la fase S del ciclo celular. En la brecha producida entre estos dos extremos se encuentra lo que catalogamos como dosis óptima que, a pesar de discutirse en una enorme cantidad de reportes, no ha quedado establecida con certeza.

En el artículo de Trujillo¹ se hace referencia al trabajo de Gould y Gross (2002), quienes hablan de una dosis de saturación al administrar 300 mg/kg. En el mismo reporte se menciona que dosis habituales de 50 mg/kg marcarían sólo una fracción de las células en fase S del giro dentado. No obstante, Trujillo¹ recoge de Miller y Nowakowski (1988) que en sus

investigaciones utilizaron dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg en roedores, sin resultados tóxicos aparentes en la progenie. En el cerebro de roedores, dosis de 60 mg/kg o mayores inducen la muerte celular durante el desarrollo embrionario y neonatal. Dosis menores (50 mg/kg) no demostraron producir efectos tóxicos en la corteza de los embriones de roedor ²⁶. El BrdU inyectado en animales gestantes puede causar malformaciones teratogénicas, paladar hendido, exencefalia, y cambios conductuales en la progenie ²⁵. La capacidad del BrdU para causar exencefalia se basa en la producción de necrosis celular del neuroepitelio ²⁷.

Cameron y McKay (2001) (citado por ¹, p. 61) indican que dosis altas de BrdU (300 mg/kg) constituyen un marcador específico, cuantitativo, y no-tóxico de células en división en el giro dentado de ratas adultas. Dosis menores marcan solo una fracción de las células en fase S (100 mg/kg alcanzarían al 60%) ²⁸. Por otra parte, se sabe que Burns y Kuan (2005) ⁷ determinaron que 50 mg/kg es una dosis suficiente para marcar la gran mayoría de las células en fase S en roedores.

La neurogénesis es afectada por diversas condiciones, entre ellas factores ambientales, fármacos, edad, estrés, enfermedades, traumatismos encéfalo-craneanos, actividad física, entre otras. Todas ellas, condiciones que alteran la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y/o el flujo sanguíneo cerebral. Cuando se trabaja en investigación de sujetos con diferentes contextos genéticos, y en distintas etapas del desarrollo, se parte de la base que la barrera hematoencefálica no tiene la misma permeabilidad en los distintos sujetos. Por ende, para determinar la dosis que marca la mayoría de las células en fase S hay que tener en cuenta la incidencia de estos factores en la disponibilidad cerebral de BrdU de cada sujeto ²⁵.

Otros análogos de la timidina

Los beneficios de la introducción de la inmunohistoquímica de BrdU al estudio de la neurogénesis en adultos, acarrearón como consecuencia avances trascendentes. Uno de los parámetros que fue posible determinar experimentalmente es el tiempo de supervivencia o “la edad de estas células” marcadas ²⁹, a lo cual Joseph Altman se refería con “birth-dating” ³⁰, calculada como el tiempo que transcurre entre la administración del BrdU al animal y el momento del sacrificio. Los tiempos cortos de supervivencia permiten identificar la cantidad y

la distribución de las células proliferantes. Tiempos largos permiten identificar el destino de las células proliferantes o sus derivadas ³¹.

Una de las limitantes del uso de un único análogo de la timidina es que sólo permite estudiar una única población de células proliferantes o derivadas de las mismas. La aplicación de inyecciones sucesivas de BrdU durante días consecutivos no permite distinguir entre distintas poblaciones celulares en división, lo cual conduce a que se interpreten como una cohorte única ²⁹. Para superar este obstáculo fue necesario introducir una nueva técnica, que permitiese marcar dos o tres subpoblaciones celulares, con distintos tiempos de supervivencia.

Una forma de llevar a cabo esta técnica podría haber sido combinando H³-timidina con BrdU, pero la autorradiografía ofrece una resolución espacial limitada, sobre todo para estudios celulares a nivel ultraestructural ³². Además, el depósito de gránulos de plata de la H³ timidina y el producto de la reacción para evidenciar inmunohistoquímicamente la incorporación de BrdU se localizan ambos en el núcleo, lo cual dificulta su discriminación ³³.

Dentro de este contexto se suscitaron las investigaciones en donde se consiguió detectar por separado a dos análogos de la timidina, IdU y CldU. La ventaja de utilizar Iododeoxiuridina (IdU) y Clorodeoxiuridina (CldU) es que ambos pueden inyectarse en el mismo animal, permitiendo la evaluación simultánea de células originadas en distintos momentos ³³. Dado que se han producido anticuerpos que reconocen específicamente a cada uno de estos análogos de la timidina por separado, es posible detectarlos mediante doble-inmunohistoquímica ³³. Inclusive, Jaunin et al ³⁴, concluyeron en 1998 que es una técnica confiable para analizar la replicación del ADN en el microscopio electrónico.

Más recientemente, la doble marcación fue optimizada utilizando IdU y CldU por Vega & Peterson ³⁵ administrado con distintos protocolos en mamíferos roedores. Mediante la implementación de esta nueva alternativa fue posible profundizar el análisis de la dinámica de la proliferación celular *in vivo*. Consiste en una nueva forma de estudiar la historia proliferativa ^{31, 35}. Se abrió el camino para lograr la determinación de la duración de la fase S de las células progenitoras neuronales, la duración de la totalidad del ciclo celular, y la duración del tiempo de duplicación, entre otros parámetros ³⁴.

La doble marcación con análogos de la timidina es un método que no está exento de limitaciones. Para que dos análogos de la timidina puedan ser utilizados satisfactoriamente deben ser revelados sin reacción cruzada de los anticuerpos primarios, deben marcar la misma cantidad de células que los otros análogos, y deben ser compatibles con los métodos inmunohistoquímicos de detección de marcadores de linaje celular ³⁵.

En la investigación de Leuner et al. ³⁶, se determinó que, al aplicar dosis de IdU y CldU comparables con dosis de saturación de BrdU, se pierde la especificidad de la detección derivando en una reacción cruzada de anticuerpos. A su vez, al trabajar con dosis de saturación de BrdU, IdU y CldU por separado no tuvieron la capacidad de marcar la misma la cantidad de células que marcó el BrdU ³⁶.

Con la intención de ampliar las opciones de este nuevo horizonte, la Etildeoxiuridina (EdU) ha surgido como una alternativa interesante. La técnica utilizada para demostrar el EdU se basa en una reacción química que no requiere la utilización de anticuerpos, por lo cual no presenta reactividad cruzada con BrdU, y a su vez, su detección es tan sensible como la de este último ³⁷. De todas maneras, su uso aún no se ha generalizado.

Utilización de virus para el estudio de la neurogénesis postnatal.

Avanzados los conocimientos en el área de la neurogénesis postnatal, comienza a despertarse la incertidumbre y la necesidad de evaluar hipótesis que vienen siendo planteadas a lo largo del tiempo en lo que refiere al entendimiento de los diferentes linajes celulares y a la migración de las nuevas neuronas ³⁸. Es en el afán del entendimiento de dónde y cómo se determina la estirpe celular de las células recientemente generadas, que se empieza a trabajar en la utilización de retrovirus para el marcaje de las células progenitoras y su descendencia para interpretar su evolución ³⁹.

El primer estudio reportado que maneja la técnica de retrovirus recombinantes data de fines de la década de 1980 ³⁸. A quién se le atribuyen los méritos de estos primeros trabajos es al investigador británico Jack Price ⁴⁰ quién inyectó una serie de vectores virales modificados a embriones de rata in útero de tal manera de estimar la cantidad de precursores en la zona ventricular telencefálica en base a la expresión de proteínas marcadoras.

Mecanismo de acción

El fundamento en la selección de retrovirus proviene del hecho de que los mismos contienen la maquinaria necesaria para garantizar su replicación in vivo y pueden ser dirigidos a un órgano diana, pueden modificarse para marcar la expresión de determinadas proteínas cuyo estudio resulte de interés, e incluso pueden ser utilizados para reemplazar genes en modelos animales con enfermedades hereditarias. Entre los vectores que contienen ARN, los más comúnmente usados provienen de la familia Retroviridae^{41,42}.

Adentrando en lo que refiere a metodología de la técnica, se destaca que tras la infección con un retrovirus su ARN es transcrito a ADN bicatenario en el citoplasma de la célula que lo alojará; este nuevo ADN entrará en el núcleo en donde se integrará al ADN cromosómico de la célula huésped y se convertirá en lo que se conoce como provirus. Dentro de la familia de los retrovirus, se reconocen tres subfamilias, a saber, orthoretroviridae, supraentroviridae y retroviridae inclassificados. Dentro de la subfamilia orthoretroviridae existen seis géneros que son alpharetrovirus, betaretrovirus, gammaretrovirus, deltaretrovirus, epsilonretrovirus y lentivirus. Las cinco primeras fueron clasificadas como oncoretrovirus, éstos, como es el caso de “murineleukemia virus (MLV)”, tienen la particularidad de que ingresan al núcleo celular durante la profase-prometáfase, es decir, al inicio de la mitosis, cuando las envolturas nucleares pierden su continuidad. Ello implica que estos retrovirus son útiles para el estudio de células en actividad mitótica, siendo, en general, una opción poco viable para el estudio de las células quiescentes. En cambio los de la familia lentivirus tienen la posibilidad de replicarse tanto en células quiescentes como mitóticas, principal diferencia con los anteriores³⁸.

Para la producción de los virus que posteriormente van a ser utilizados para estudiar la neurogénesis, los investigadores debieron seleccionar a los mismos y prepararlos de tal manera que sean capaces de infectar a la célula pero evitando que los mismos continúen con su ciclo normal de replicación y consecuente daño al huésped. Entre los más utilizados se describen el MLV, virus HIV – 1, SemlikiForest Virus (SFV).^{43,44}

La familia de los lentivirus posee en su estructura tres genes que son de tipo estructural, ellos son *gag*, *pol*, y *env*, parte de la estrategia de inactivación es disponer estos genes en distintos plásmidos que serán introducidos por transfección a líneas celulares que

posteriormente serán infectadas por virus que carecen de *gag*, *pol* y *env*, de manera que no estén presentes en la secuencia de ARN pero que estén disponibles sus proteínas al momento de la replicación del virus. Por lo tanto estas líneas celulares de empaquetamiento, como son llamadas, posibilitan la producción de virus que quedarán disponibles para infectar y marcar una célula diana pero que carecerán de los genes citados disminuyendo así su riesgo biológico^{39, 41, 45}.

Dentro de las modificaciones virales que se describen como posibles para el marcaje de células dianas, se encuentra la introducción de secuencias que codifican proteínas que posteriormente serán detectadas por inmunoblot o proteínas fluorescentes que posteriormente son ubicadas mediante el escaneo de la muestra con microscopía láser confocal^{42,45-47}.

Dentro del aporte que esta técnica ha hecho en el mundo de la neurogénesis se puede destacar que reveló una perspectiva que permitió contrastar la hipótesis de unidad radial postulada por Rakic (1995)³⁸ que proponía que la migración neuronal ocurre de modo radial, estableciendo que además existe una disposición horizontal y un movimiento tangencial que llevan a cabo las neuronas generadas luego del nacimiento en la zona Sub-ventricular.

Limitaciones para su uso

Dentro de lo que son desventajas de esta técnica se señala la necesidad de cirugía estereotáxica para la introducción de los virus en el área de interés que conlleva a reacciones inflamatorias locales. Y se menciona también el hecho de las modificaciones que puede sufrir la expresión retroviral por los fenómenos epigenéticos provocando, en algunos casos, un posible silenciamiento del virus³⁸.

Resonancia Nuclear Magnética

Los primeros artículos sobre Resonancia Magnética Nuclear (RNM) fueron publicados alrededor de 1940, por dos grupos de investigación, uno de ellos liderado por Edward Mills Purcell (físico estadounidense) y el otro por Félix Bloch (físico suizo)⁴⁸.

Si nos centramos en la aplicación que estos descubrimientos han tenido para la medicina, podemos destacar lo que dice Àlex Rovira Cañellas⁴⁹ en su artículo Nuevas aplicaciones diagnósticas de la resonancia magnética en neurología: “En la aplicación de la

RMN en medicina se han observado diferentes fases relacionadas directamente con los avances tecnológicos que han ido aconteciendo”. En este artículo Rovira señala que la RNM tuvo varias etapas en relación a su aplicación. A la primera la nombra como una etapa “analítica”, en ésta el aporte clave de Damadlan (1971) (citado por ⁴⁹, p.741) fue la aplicación de la RNM para la discriminación entre tejido normal y neoplásico en animales de experimentación. Seis años después Hinshaw et al (1997) (citados por ⁴⁹, p.741) publican en la revista *Nature* la primera imagen obtenida en humanos. Finalmente, Hawkes et al (citados por ⁴⁹, p.741) realizan el primer estudio de patologías encefálicas en 1980.

Desde entonces la RNM ha ido evolucionando a pasos agigantados, aportando grandes avances en el campo de la medicina, sobre todo lo que tiene que ver con el diagnóstico y seguimiento de enfermedades de diversas índoles, no solo por su alta resolución espacial, sino por su carácter de inocuidad por no utilizar radiaciones ionizantes.

En una investigación realizada por McNamara ⁵⁰ titulada: *Deciphering the Role of Docosahexaenoic Acid in Brain Maturation and Pathology with Magnetic Resonance Imaging* se destaca que las técnicas de RNM modernas permiten la investigación de los cambios que se producen en las distintas estructuras de la corteza cerebral (cambios químicos y/o funcionales), pudiendo de esta manera establecer la correlación entre dichos cambios y las manifestaciones clínicas de determinada enfermedad. En la investigación anteriormente mencionada McNamara quiso determinar el papel que tiene el ácido docosahexaenoico (DHA) tanto en el proceso de maduración del cerebro, como en el desarrollo de distintas patologías psiquiátricas utilizando RNM como método de análisis y propuso que existen varias técnicas potenciales de neuroimagenología con el fin de determinar el papel del DHA. Por motivos prácticos de nuestra monografía decidimos destacar tres de ellas:

1. Resonancia Magnética estructural, como un indicador de los volúmenes existentes de sustancia gris y blanca, tanto en zonas corticales como subcorticales del encéfalo.
2. Resonancia Magnética funcional (fMRI), la cual evidencia los cambios que se producen en el proceso de activación cortical. Esto lo hace a través de la determinación de los niveles de oxígeno en la sangre, los cuales se van modificando durante la actividad sináptica (que incluye la activación y repolarización neuronal).

3. Espectrometría de Protones por Resonancia Magnética (MRS 1H), es la que determina las concentraciones de ciertos marcadores químicos que están íntimamente relacionados con el mantenimiento de los procesos metabólicos en la corteza.

Diversas investigaciones citadas en ⁵⁰ destacan los grandes descubrimientos de la Resonancia Magnética Estructural. Entre ellos resalta los reportados por Giedd et al (2010) (citado por ⁵⁰, p.4) diciendo: “Estudios de RM estructurales longitudinales han encontrado que el período entre la niñez y la adolescencia temprana (7-12 años) se asocia a una rápida expansión de la densidad de materia gris cortical, mientras que el período entre la adolescencia (13-18 años) y la edad adulta joven (≥ 8 años) se asocia con una pérdida progresiva de la densidad de materia gris cortical, que se estabiliza en la tercera década de la vida”.

Además de proporcionar una alta resolución, la RNM ofrece una variada gama de contrastes específicos, que permiten adquirir imágenes dependiendo de las propiedades físico-químicas de cada tejido, así como de la movilidad de rotación de las moléculas ⁵¹.

Park et al (citado por ⁵², p.1) afirman que “la producción de nuevas neuronas en el cerebro adulto se asocia con la función cognitiva, la respuesta a las terapias, enfermedades neurodegenerativas, y el envejecimiento”. En dicha investigación se señala la importancia que tiene el rastreo de células mitóticamente activas dentro del sistema nervioso central, tanto sea para el diagnóstico de diversas enfermedades como para evaluar las respuestas a los distintos tratamientos. Además de resaltar a la MRS 1H como una de las técnicas imagenológicas capaces de permitir el seguimiento del proceso de neurogénesis, remarca que la Tomografía por Emisión de Positrones (PET) en combinación con ligandos radioactivos es una técnica que se ha demostrado que es capaz de cumplir con dicho objetivo (citado por ⁵², p.1).

La RNM proporciona una alta resolución espacial para la visualización de la anatomía en general. Además se han creado nanopartículas que se autoensamblan a secuencias específicas de ARN, las cuales muchas de ellas están fuertemente implicadas en el proceso de neurogénesis. Dichas nanopartículas generan una señal magnética cuando son sometidas al resonador, brindándonos información muy valiosa en el momento de realizar un seguimiento sobre la neurogénesis en determinado sector del SNC ⁵³.

En suma la RNM es una técnica de extremado valor para analizar cambios funcionales y tiene la capacidad de mejorar la visualización de los tejidos a través de la utilización de medios de contraste. Por eso se diferencia y destaca de las técnicas de imagenología molecular que utilizan un agente marcador que depende de la función del tejido que se estudie, por lo cual deben ser apareadas con otras técnicas imagenológicas, como puede ser la Tomografía Computada para una correcta correlación anátomo-funcional.⁵⁴.

APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS EN EL CAMPO DE LA MEDICINA

Con la intención de puntualizar cómo todas estas técnicas han contribuido en el campo de la medicina, decidimos en este apartado destacar diversas implicancias clínicas que se fueron planteando gracias al conocimiento cada vez mayor de la neurogénesis.

Un claro ejemplo donde se produce una muerte neuronal importante es el ataque cerebro vascular (ACV). Dicha enfermedad se produce por la isquemia en un sector del cerebro secundaria a una oclusión arterial. Luego de establecerse el ACV aparecen en el parénquima cerebral dos áreas lesionales, la primera es la zona infartada propiamente dicha (núcleo del infarto) donde las neuronas mueren por necrosis, y la segunda a la que se le denominada penumbra. Ésta rodea al núcleo de la lesión y esta perfundida por las arterias colaterales, por lo cual en este sector la lesión neuronal es potencialmente reversible. Es por esto que intervenciones que modulen la neurogénesis podrían ser aprovechadas como un posible tratamiento para los pacientes que padecen esta enfermedad (citado por⁵⁵, p. 12).

En enfermedades neurodegenerativas como puede ser la enfermedad de Alzheimer, se ha visto tanto en seres humanos como en modelos murinos de la enfermedad que existe una disminución de la proliferación neuronal en la ZSV. Algo similar sucede en el hipocampo, aunque lo que prevalece en esta zona es una disminución de la diferenciación y supervivencia de las neuronas recién nacidas (citado por 55, p. 10).

En los pacientes que sufren depresión se ha visto que existe una disminución del capital neuronal. Los antidepresivos que se indican a estos pacientes, como pueden ser los inhibidores de la recaptación de serotonina, tienen la capacidad de aumentar la proliferación en el hipocampo de roedores. En humanos se ha visto que tienen el potencial de aumentar las células

progenitoras neuronales en igual zona. Estos descubrimientos son alentadores, ya que ponen a la neurogénesis como posible tratamiento de esta patología en el futuro^{55,56}.

Si dentro del SNC nos centramos en la medula espinal y las patologías que ella engloba, el panorama no es tan alentador. Aún no se ha encontrado la forma de estimular la proliferación y diferenciación neuronal en este sector del SNC, pero como Ramón y Cajal (1914) afirma (citado por¹, p. 67) “toca a la ciencia del porvenir casar, si ello es posible, la ardua sentencia”.

CONCLUSIONES

La neurociencia ha sido objeto de cambio de grandes dogmas quedando demostrado cómo los avances tecnológicos traen consigo descubrimientos que obligan a la comunidad científica a replantearse conceptos, así como también se ve la contraparte de que los avances conceptuales traen consigo la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías que permitan demostrar la veracidad de lo que se plantea.

Hemos visto como la técnica de Golgi, que si bien nunca fue usada para el estudio de la neurogénesis en sí, sino que fue y es una técnica aplicada más que nada para los estudios anatómicos, fue la primera en hacerles ver a los investigadores lo poco que se conocía en lo que a estructura del sistema nervioso central se refiere, y vimos cómo gracias a esta técnica, y a la necesidad de responder a nuevas preguntas un grupo de investigadores en 1957 desarrolló el microscopio confocal.

Siguiendo el curso temporal, analizamos el hecho de que en 1960 se produce un hito en el estudio de la neurogénesis cuando J. Altman et al.³ obtuvieron evidencia sustancial de la existencia del proceso de neurogénesis, valiéndose de la técnica autorradiográfica de marcación con H³-timidina. Este hecho que fue muy cuestionado inicialmente y recibió críticas a la técnica. Por un lado se apeló a que dada su radiactividad podía modificar los ciclos celulares y por otro lado se cuestionó su reproducibilidad dada la gran complejidad de los protocolos a los que el investigador debía estar habituado.

En el afán de consolidar los nuevos conceptos que se están desarrollando en base a técnicas de alto coste y difícil reproducibilidad, vimos como en 1989 Nowakowski et al.³¹ introducen al campo de investigación una técnica que se basa en el uso de un análogo de la

timidina, el BrdU. Esta técnica significó una consolidación del concepto de neurogénesis postnatal ya que permitió facilitar la reproducción de experimentos, dado el menor costo que las técnicas que se manejaban antiguamente, y a su vez permitió dejar de lado los tan cuestionados materiales radiactivos.

Adentrados en los nuevos conocimientos los investigadores comienzan a trabajar en técnicas que además del marcaje de procesos de replicación de ADN tengan la capacidad de analizar los linajes celulares, es entonces que en la década de 1990 se comienza a trabajar en el marcaje de linajes celulares valiéndose de marcadores virales, técnica que pese a sus aportes fue criticada por el riesgo biológico que implica su aplicación en humanos.

Ante la creciente necesidad de estudiar el fenómeno de la neurogénesis en el cerebro humano, se comienza recientemente a experimentar con técnicas no invasivas y biológicamente inofensivas como la RNM, técnica que abrió una nueva puerta para el estudio de cómo se relacionan estos descubrimientos de la neurogénesis post natal con los procesos fisiopatológicos que subyacen a enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central. A su vez vimos que es una técnica prometedora en lo que refiere al entendimiento de la aplicabilidad de estos nuevos conocimientos en el campo del tratamiento tanto de estas enfermedades como de las personas que sufren de otras entidades nosológicas, así como aquellas que son víctima de accidentes que resultan en el compromiso de alguna parte de su sistema nervioso.

A modo de apreciación personal y con una orientación clínica del tema, nos gustaría mostrar con este trabajo cómo los avances en el tema resultan esperanzadores para aquellas personas que sufren patologías neurológicas que hasta el día de hoy se consideran de curso evolutivo irreversible. También nos parece de capital importancia el conocimiento de los mecanismos subyacentes a este fenómeno dado que tal vez, es aquí donde se encuentra la solución para aquellos que sufren trastornos neurodegenerativos.

Bibliografía

1. Cenóz OT, Fernández A, Radmilovich M. Neurogenesis Postnatal . Cambian arraigados conceptos referentes a la arquitectura , fisiología y patología del sistema nervioso central. 2002;55–69.
2. Breunig JJ, Haydar TF, Rakic P. Neural Stem Cells: Historical Perspective and Future Prospects. *Neuron* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;70(4):614–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.005>
3. Altman J. The Discovery of Adult Mammalian Neurogenesis. In: Seki T, Sawamoto K, Parent JM, Alvarez-Buylla A, editors. *Neurogenesis in adult brain I. Japan*: Springer; 2011. p. 3-42.
4. Gage FH, Van Praag H. Neurogenesis in adult brain. In: Kenneth LD, Charney D, Coyle JT, Nemeroff Ch, editors. *Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress*. Philadelphia: Neuropsychopharmacology; 2002. p.109-117.
5. Gil-Perotín S, Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM Identification and characterization of neural progenitor cells in the adult mammalian brain [monograph on the Internet].. Heidelberg Berlin: Springer-Verlag; 2009. [cited 2015 Oct 12]. Available from: https://books.google.com.uy/books?hl=es&lr=&id=cXP8rZWsx5UC&oi=fnd&pg=PP2&dq=Id+entification+and+characterization+of+neural+progenitor+cells+in+the+adult+mammalian+brain&ots=LzXo_j6iUl&sig=TfjG77KD7cNAYPyyXlkWazG7b8g#v=onepage&q=Nottebohm&f=false.
6. Ming G, Song H. Adult Neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions *Neuron*. May 2011; 70 (4): 687 – 702.
7. Taupin P. Adult neural stem cells: The promise of the future. *Neuropsychiatr Dis Treat* [Internet].2007;3(6):753–60.Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19300610
8. Arias-Carrión Ó, Olivares-Bañuelos T, Drucker-Colín R. Neurogénesis en el cerebro adulto. *Rev Neurol*. 2007;44(9):541–50.

9. Fuchs E, Flügge G. Adult neuroplasticity: more than 40 years of research. *Neural Plast* [Internet]. 2014;2014:541870. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4026979&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
10. Font E, Desfilis E, Pérez-Cañellas M.M, García-Verdugo J.M. Neurogenesis and Neuronal Regeneration in the Adult Reptilian Brain. *Brain Behav Evol.* 2001;58(5):276–95.
11. Cheung AFP, Pollen A a., Tavare A, Deproto J, Molnár Z. Comparative aspects of cortical neurogenesis in vertebrates. *J Anat.* 2007;211:164–76.
12. García-Verdugo JM, Ferrón S, Flames N, Collado L, Desfilis E, Font E. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammal. *Brain Res Bull* 2002 April 57(6):765–775.
13. Mendoza JRA. A 120 años del metodo de golgi. 1926;2.
14. Fernández OT, Técnica L a, Argéntica DEI, Conmemoración DEG, Torres-fernández O. La técnica de impregnación argéntica de Golgi . Conmemoración del centenario del premio nobel de Medicina (1906) compartido por Camillo Golgi y Santiago Ramón y Cajal. *Medicina (B Aires).* 2006;26:498–508.
15. Sambasivarao S V. NIH Public Access. 2013;18(2):1199–216. 16. Ramón J “Los métodos de Golgi”. Ediciones Universidad de Salamanca; 1994. ISBN: 84-7481-767-6.
16. Alonzo JR. Los métodos de Golgi. 1ª ed. España; Ed Univ Salam; 1994.
17. Taylor JH, Woods PS, L HW. The Organization and Dupliation of Chromosomes as Revealed by Autoradiographic Studies using Tritium-Labelled Thymidine. *Proc Natl Acad Sci.* 1957;43(1):122–8.
18. Folkers, C. Tritium: Health consequences [Monografía en internet]. Takoma Park, MD: Nuclear information and resource service; 2006 [Consultado el 23/7/2015]. Disponible en: <http://www.nirs.org/factsheets/tritiumbasicinfo.pdf>

19. Rubini JR, Cronkite EP, Bond VP, Fliedner TM. The metabolism and fate of tritiated thymidine in man. *J Clin Invest.* 1960;39(10):909–18.
20. Straus MJ, Straus SE, Battiste L, Krezoski S. The uptake, excretion, and radiation hazards of tritiated thymidine in humans. *Cancer Res.* 1977;37(2):610–8.
21. Van de Riet WG, Shaw EI. A radiation effect from metabolism of tritiated thymidine. *Radiat Res.* 1970;43(2):416–28.
22. Lin P, Allison DC. Measurement of DNA content and of tritiated thymidine and bromodeoxyuridine incorporation by the same cells. *J Histochem Cytochem.* 1993; 41(9):143-59.
23. Kuhn HG, Peterson DA. Detection and phenotypic characterization of adult neurogenesis. In: Gage FH, Kempermann G, Song H, editors. *Adult Neurogenesis.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press; 2007. p. 25-47.
24. Cavanagh BL, Walker T, Norazit A, Meedeniya ACB. Thymidine Analogues for Tracking DNA Synthesis. *Molecules* [Internet]. 2011;16(12):7980–93. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/9/7980/>
25. Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *ELSEVIER, BRAIN Res Rev.* 2006;198–208.
26. Duque a., Rakic P. Different Effects of Bromodeoxyuridine and [3H]Thymidine Incorporation into DNA on Cell Proliferation, Position, and Fate. *J Neurosci* [Internet]. 2011;31(42):15205–17. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3092-11.2011>
27. Bannigan JG. “The effects of 5-bromodeoxyuridine on fusion of the cranial neural folds in the mouse embryo”. *Teratology*, 1985. Oct 32(2):229-239
28. Cameron HA, McKay RD. “Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus”. *Journal of Comparative Neurology*, 2001. July 9, 435(4):406-417.

29. Llorens-Martín M. Multiple birthdating analyses in adult neurogenesis: a line-up of the usual suspects. *Front Neurosci* [Internet]. 2011;5(May):1–8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2011.00076/abstract>
30. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. Junio 1965, 124 (3): 319-335
31. Nowakowski RS, Caviness VS, Takahashi T, Hayes NL. Population dynamics during cell proliferation and neurogenesis in the developing murine neocortex. *Results Probl Cell Differ* [Internet]. 2002;39:1–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12353465>
32. Vecchio L, Solimando L, Biggiogera M, Fakan S. Use of Halogenated Precursors for Simultaneous DNA and RNA Detection by Means of Immunoelectron and Immunofluorescence Microscopy. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2007;56(1):45–55. Available from: <http://jhc.sagepub.com/lookup/doi/10.1369/jhc.7A7225.2007>
33. Bakker PJ, Stap J, Tukker CJ, van Oven CH, Veenhof CH, Aten J. An indirect immunofluorescence double staining procedure for the simultaneous flow cytometric measurement of iodo- and chlorodeoxyuridine incorporated into DNA. *Cytometry* [Internet]. 1991;12:366–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2065560>
34. Jaunin F, Visser a E, Cmarko D, Aten J a, Fakan S. A new immunocytochemical technique for ultrastructural analysis of DNA replication in proliferating cells after application of two halogenated deoxyuridines. *J Histochem Cytochem*. 1998;46(10):1203–9.
35. Vega C, Peterson DA. Stem cell proliferative history in tissue revealed by temporal halogenated thymidine analog discrimination. *Nature Methods*. 2005, 2 (3): 167-169.
36. Leuner B, Glasper ER, Gould E. Thymidine analog methods for studies of adult neurogenesis are not equally sensitive. *J Comp Neurol*. 2009;517(2):123–33.
37. Chehrehasa F, et al. EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *J Neurosci Methods*. 2009, 177: 122-130.

38. Zhao C. Retrovirus-mediated cell labelling In: Gage FH, Kempermann G, Song H, editors. *Adult Neurogenesis*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press; 2007. pp. 101-117.
39. Cepko CL, Ryder E, Austin C, Golden J, Fields-Berry S, Lin J. Lineage analysis using retroviral vectors. *Methods*. 1998;14(4):393–406.
40. Price J, Williams B, Grove E. Cell lineage in the cerebral cortex. *Development*. 1991;Suppl 2:23–8.
41. Blesch a. Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer. *Methods* [Internet]. 2004;33(2):164–72. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202303003086>
42. Roybon L, Mastracci TL, Li J, Stott SRW, Leiter AB, Sussel L, et al. The Origin, Development and Molecular Diversity of Rodent Olfactory Bulb Glutamatergic Neurons Distinguished by Expression of Transcription Factor NeuroD1. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(6):e0128035. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0128035>
43. Rothenaigner I, Krecsmarik M, Hayes J a., Bahn B, Lepier a., Fortin G, et al. Clonal analysis by distinct viral vectors identifies bona fide neural stem cells in the adult zebrafish telencephalon and characterizes their division properties and fate. *Development* [Internet]. 2011;138(8):1459–69. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.058156>
44. Henao LF, Yepes JO, Alvarez CM, Balcázar N, Navas MC. Expresión de la proteína verde fluorescente y de la proteína Core del Virus de la Hepatitis C en la línea de hepatoma HepG2. *Actual Biol*. 2004;26(80):23–9.
45. Sheridan P. Generation of Retroviral Packaging and Producer Cell Lines for Large-Scale Vector Production and Clinical Application: Improved Safety and High Titer. *Mol Ther* [Internet]. 2000;2(3):262–75. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1006/mthe.2000.0123>
46. Witte OW, Lie DC, Redecker C. Aberrant Neurogenesis After Stroke: A Retroviral Cell Labeling Study. *Stroke* [Internet]. 2012;43(9):2468–75. Available from: <http://stroke.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/STROKEAHA.112.660977>

47. Jessberger S, Zhao C, Toni N, Clemenson GD, Li Y, Gage FH. Seizure-Associated, Aberrant Neurogenesis in Adult Rats Characterized with Retrovirus-Mediated Cell Labeling. *J Neurosci* [Internet]. 2007;27(35):9400–7. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2002-07.2007>
48. Ferrando FS. Breve resumen histórico de la resonancia magnética nuclear. Bellaterra, Barcelona: Univ Aut Barc. p. 1-14
49. Cañellas ÀR. Nuevas aplicaciones diagnósticas de la resonancia magnética en neurología. 2015;118(19):741–4.
50. Mcnamara RK. Deciphering the role of decosahexanoic acid in brain maturation and pathology with magnetic resonance imaging. 2014;1–24
51. Sierra a., Gröhn O, Pitkänen a. Imaging microstructural damage and plasticity in the hippocampus during epileptogenesis. *Neuroscience* [Internet]. 2015; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452215003954>
52. Park J-H, Lee H, Makaryus R, Yu M, Smith SD, Sayed K, et al. Metabolic Profiling of Dividing Cells in Live Rodent Brain by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy (1HMRS) and LCModel Analysis. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(5):e94755. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0094755>
53. Lee J, Jin Y a, Ko HY, Lee YS, Heo H, Cho S, et al. Magnetic resonance beacon to detect intracellular microRNA during neurogenesis. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;41:69–78. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961214011934153>.
<http://www.sciencedirect.com.proxy.timbo.org.uy:443/science/article/pii/S0142961214011934>
 . Fecha de acceso: 13 de agosto del 2015
54. Magnetic Insight, Inc. [internet] Newark, California. Editorial: Magnetic Insight [Citado el 22 de Agosto de 2015] Disponible en: <http://www.magneticinsight.com/>
55. Sierra A, Encinas JM, Maletic-Savatic M. Adult human neurogenesis: From microscopy to magnetic resonance imaging. *Front Neurosci*. 2011;5(APR):1–18.

56. Duke D, Students M, Huddleston D. MRI Detection of Neurogenesis in Human Subjects : A Pilot Study. *Analysis*. 2005;IV(August 2003):2004–5.

57. Santos-Marcial E. Neurogénesis de células progenitoras de la zona subventricular. *Rev Mex Neurocienc*. 2008;9(3):202–5.

ANEXOS

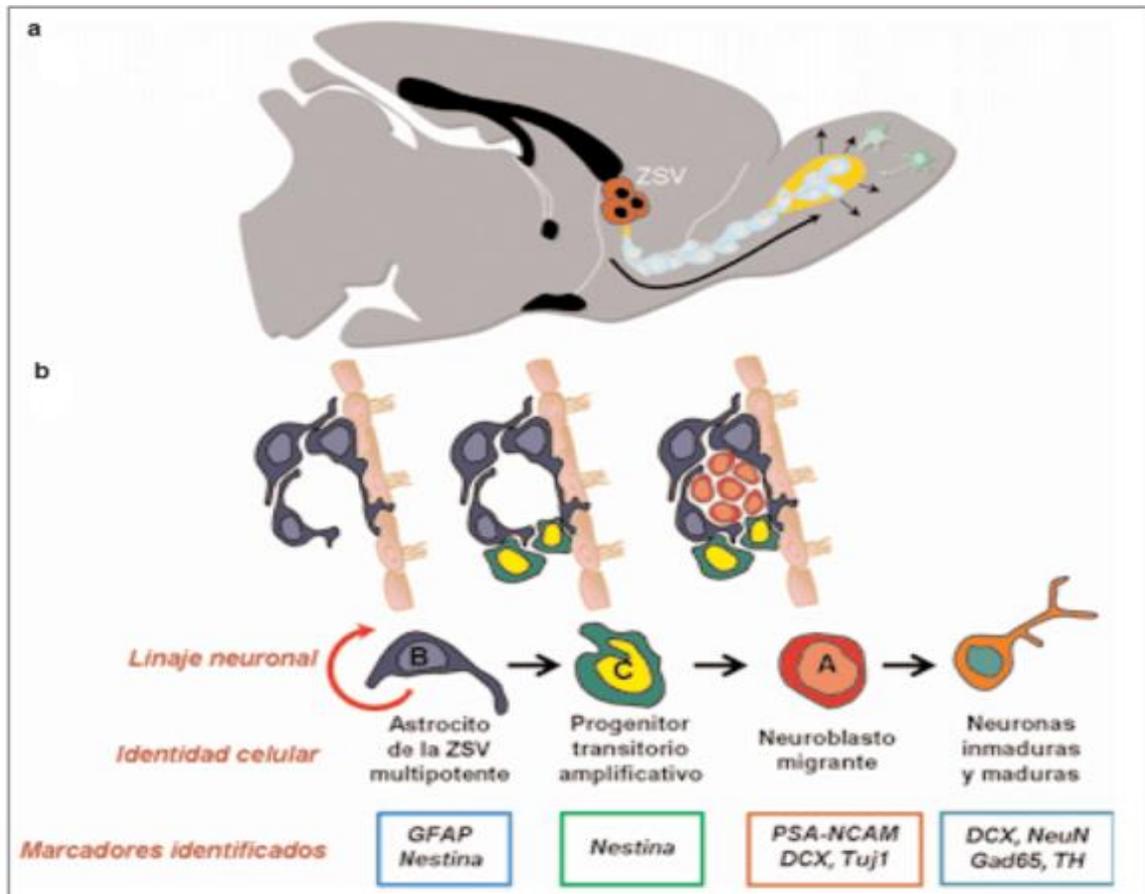


Figura 1. Proceso neurogénico de la zona subventricular. Extraído de Arias-Carrión et al⁸.

Factores que estimulan la neurogénesis postnatal			
Zonas del cerebro del mamífero adulto		Zona subventricular	Zona subgranular
Factores de crecimiento	Factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2)	X	
	Factor de crecimiento tipo insulina (IGF)	X	X
	Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)	X	X
	Factor de crecimiento epidérmico ligado a heparina (HB-EGF)	X	X
	Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	X	X
Neurotransmisores	Noradrenalina	X	X
	Dopamina	X	X
	Serotonina	X	X
	Antagonista del glutamato (MK801)		X
Hormonas	Estrógeno		X
Factores personales y ambientales	Ambiente enriquecido	X	X
	Actividad física	X	X
	ACV, isquemia	X	X
	Epilepsia	X	X
Factores que inhiben la neurogénesis postnatal			
Factores de crecimiento	Factor de crecimiento epidérmico (EGF) (favorece diferenciación en glía)	X	
Neurotransmisores	Glutamato	X	
Hormonas	Glucocorticoides		X
Factores personales y ambientales	Edad	X	X
	Estrés	X	X
	Depresión	X	X

Tabla1. Factores que regulan la neurogénesis postnatal en las zonas subventricular y subgranular ^{4,7,8}

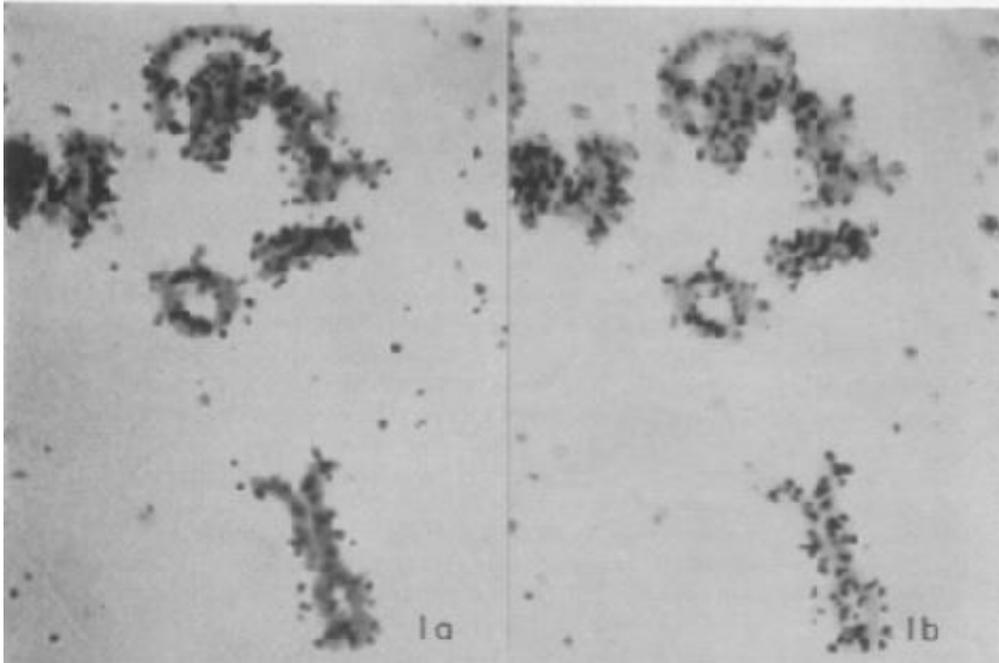


Figura 2. Microfotografías de diversos cromosomas en metafase en la primera división luego de la marcación con H^3 -timidina; a, cromosomas con las cromátides separadas pero aun unidas en el centrómero; b, granos en la emulsión por encima de los cromosomas.

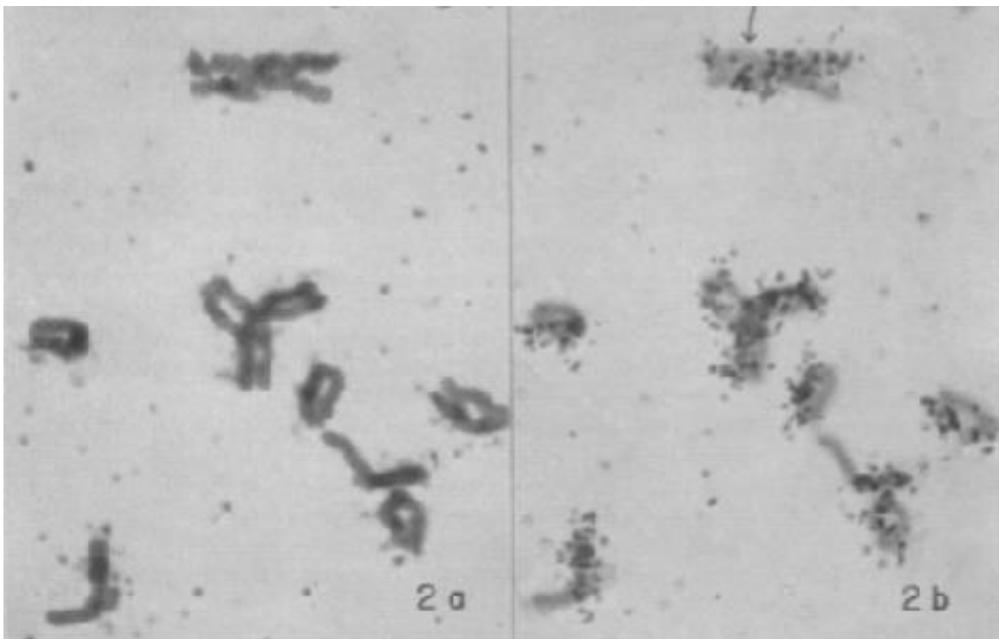


Figura 3. Fotografía de diversos cromosomas luego de la marcación con H^3 -timidina y una replicación en ausencia de precursor marcado; a, diversos cromosomas de una célula que contiene 24 cromosomas con las cromátides separadas pero unidas en el centrómero; b, granos en la emulsión por encima de los cromosomas en a. Extraído de Taylor et al¹⁷.

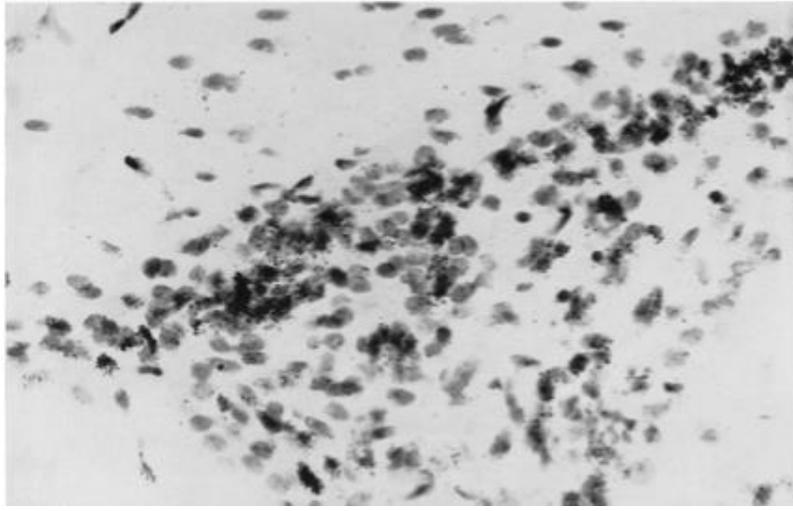


Figura 4. “Autorradiograma mostrando células marcadas en la capa subependimal del prosencéfalo de una rata adulta que fue inyectada intraperitonealmente con una sola dosis de H³-timidina 2 semanas antes de ser sacrificada” Extraído de Altman³.

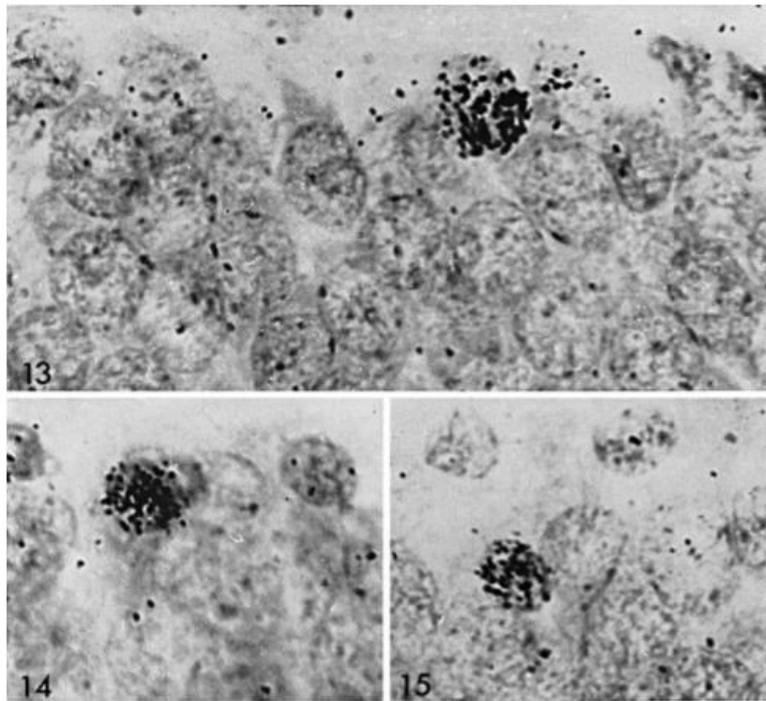


Figura 5. “Autorradiograma de células granulares marcadas cerca del giro dentado del hipocampo de una rata adulta inyectada intraperitonealmente con H³-timidina y que fue sacrificada 2 semanas después” Extraído de Altman³.

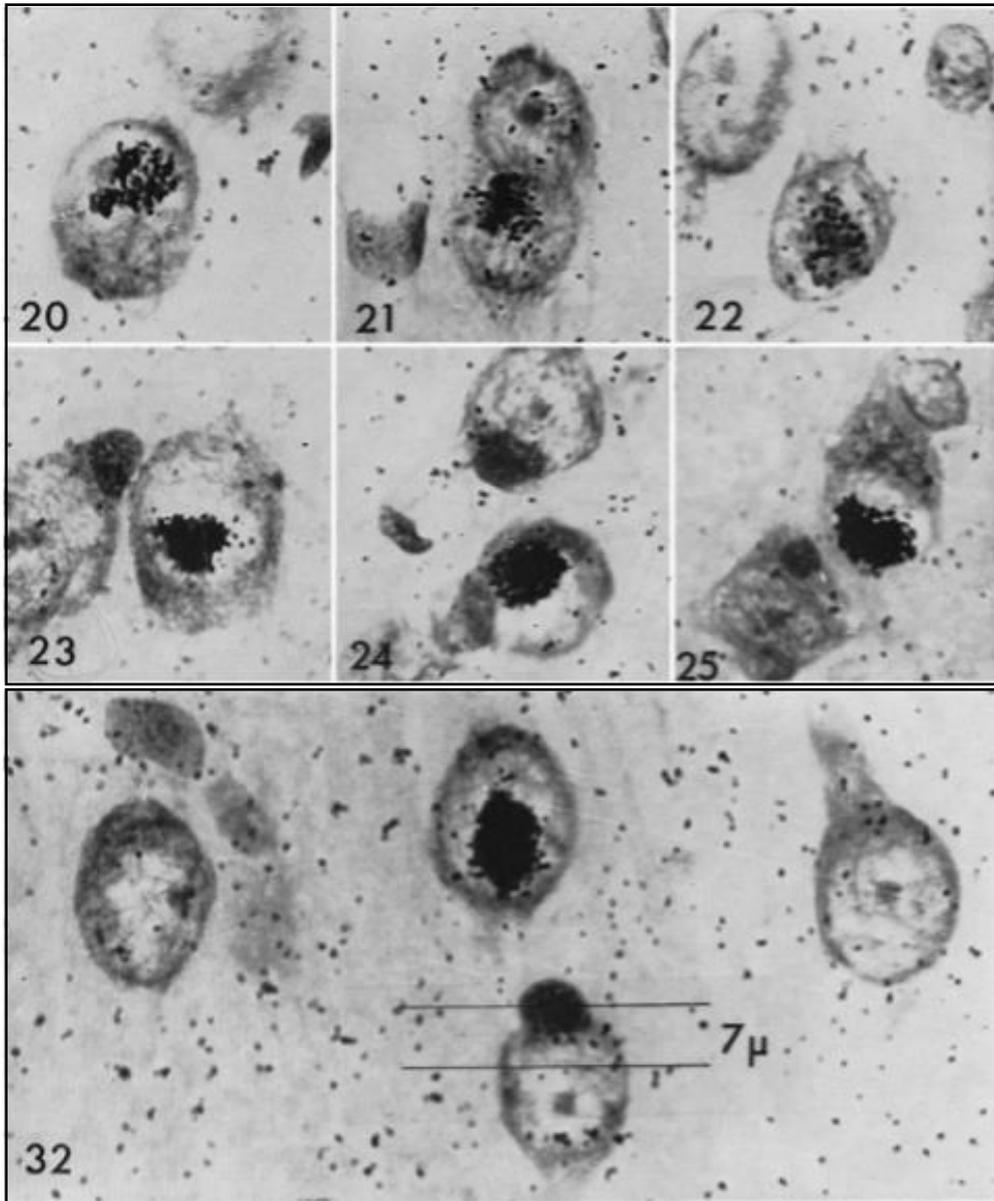


Figura 6. “Panel superior: Autorradiogramas de neuronas neocorticales aparentemente marcadas en un gato adulto que fue inyectado intraventricularmente con H³-timidina. Panel inferior: Autorradiograma para ilustrar la posibilidad de que en las secciones de 7μm de espesor, la marcación de algunas neuronas podría provenir de la glia perineuronal”. Extraído de Altman³.

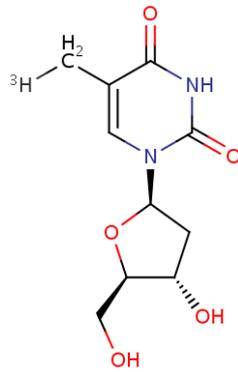


Figura 7. Estructura de la H^3 -timidina. Extraído de Chemical Entities of Biological Interest [homepage en internet].Cambridgeshire UK: EMBL-EBI; c2012. [actualizada 06/03/2012; consultado 20/7/2015] Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/chebiOntology.d?treeView=true&chebiId=CHEBI:53527>.

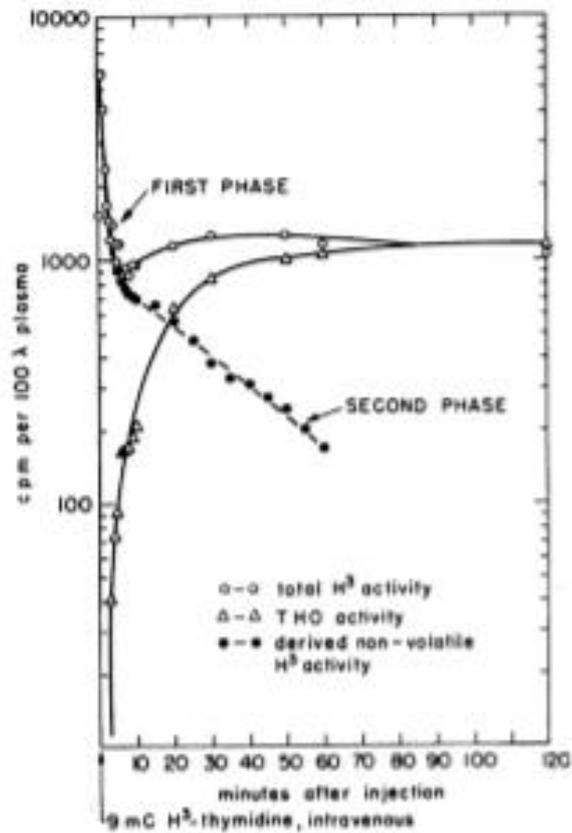


Figura 8. “Actividad plasmática del tritio luego de la inyección intravenosa de H^3 -timidina” Extraído de Rubini et al¹⁹.

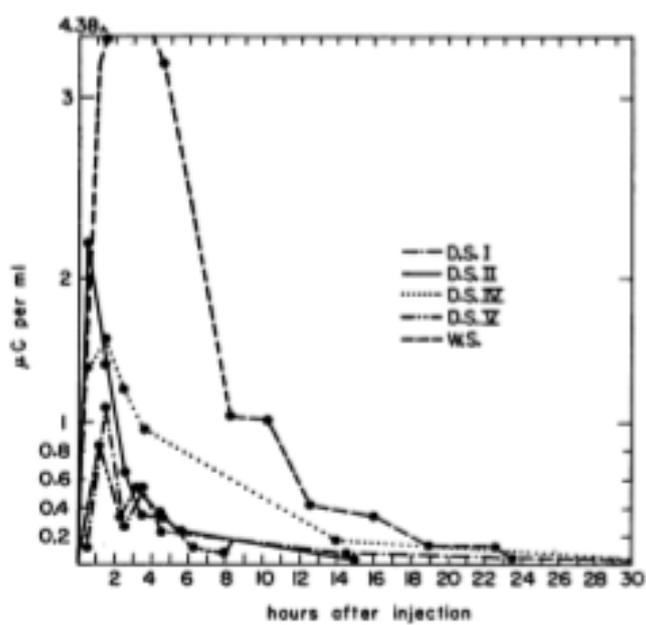


Figura 9. “Actividad de compuestos no volátiles tritiados excretados por vía urinaria en función del tiempo post-inyección. Extraído de Rubini et al¹⁹.”

Ventajas	Desventajas
Autorradiografía de alta resolución ²⁰ .	Exposición del sujeto de estudio a radiación ²¹ .
Alta especificidad para demostrar la replicación celular.	Exposición a radiación del personal que manipula el material ²¹ .
Buena capacidad de unión al ADN celular logrando una buena marcación. Esta marcación es de la misma calidad que la lograda con técnicas más modernas como el BrdU ²² .	Difícil manejo de la técnica (“utilización de la actividad específica adecuada, inyección de la dosis óptima del radio-químico en relación a la masa corporal del animal, dilución adecuada y consistente de la emulsión nuclear, lento secado de la emulsión en la oscuridad antes del empaquetado y refrigeración para evitar artefactos mecánicos, períodos de exposición muy largos para obtener resultados óptimos, y uso de técnicas de contraste que no remuevan parte o toda la emulsión” ³ .
“Técnica invaluable para el estudio del tiempo de origen de las neuronas en una variedad de especies” ² .	“Es difícil, usando microscopía de campo brillante, detectar la deposición de granos de plata en combinación con marcación con inmunoperoxidasa para marcadores fenotípicos, debido a su superposición en la visualización del oscurecimiento celular” ²³ .
	“Los cortes necesarios para realizar una autorradiografía son muy finos por lo que limitan el uso de la cuantificación estereológica” ²³ .
	Marcador de síntesis de ADN no solamente de replicación, por lo que también puede marcar reparación del mismo e interrupción de la mitosis en neuronas que mueren ² .
	“Se halló que la H ³ timidina estimula los procesos de reparación del ADN” ² .
	Es una técnica que consume mucho tiempo ²⁴ .

Tabla 2. Ventajas y desventajas de la H³-timidina para el estudio de la neurogénesis postnatal.