

**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Estudio de células serotoninérgicas
en respuesta a una lesión en la
médula espinal de la tortuga

Carina Aldecosea Baeza

Orientador: Dr. Raúl E. Russo

*Tribunal: Dr. Raúl E. Russo
Dr. Sebastián Curti
Dra. Nathalia Vitreira*

21-07-2016

Estudio de células serotoninérgicas en respuesta a una lesión en la médula espinal de la tortuga

INTRODUCCIÓN

La lesión de la médula espinal en los mamíferos resulta en una pérdida irreversible de actividad motora y percepción sensorial. En algunos vertebrados inferiores como la tortuga, se genera un puente celular que reconecta los muñones rostral y caudal de la médula lesionada, contribuyendo a una recuperación parcial de la actividad sensorio-motriz (Rehermann et al., 2009). Además de la re-conexión anatómica es posible que los cambios plásticos de los circuitos espinales por debajo de la lesión cumplan un papel fundamental en la recuperación de la actividad locomotora. La identificación de los mecanismos implicados en la recuperación funcional de la médula espinal en la tortuga podría dar luz a futuras estrategias terapéuticas (Rehermann et al., 2011).

Organización jerárquica de los sistemas motores

Los sistemas motores poseen una organización jerárquica que es esencial para la realización de distintos tipos de movimientos, desde aquellos de tipo rítmico a los de gran precisión y velocidad. Los circuitos motores están distribuidos en la médula espinal, tronco encefálico y la corteza motora, así como en estructuras como los ganglios basales y el cerebelo. El mayor nivel de complejidad está representado en la corteza motora, en tanto la médula espinal es la estructura encargada de la ejecución y de menor complejidad. La médula espinal contiene a las motoneuronas que son la vía final común de los sistemas motores, conectadas de manera monosináptica con unas pocas fibras sensoriales, o como se da en la gran mayoría de los casos, con interneuronas interpuestas entre la neurona sensitiva primaria o axones supraespinales y la motoneurona. El tronco encefálico está invadido por axones que provienen de la corteza cerebral y núcleos subcorticales, y va a proyectar sus axones a la médula espinal. La corteza motora primaria y las áreas premotoras se proyectan directamente hacia la médula espinal y modulan las vías provenientes del tronco encefálico. Las aferencias de axones supraespinales pueden modular las respuestas

reflejas y automatismos contenidos en la médula espinal en forma de Generadores de Patrones Centrales. La información motora proveniente de todos los niveles va a converger sobre las motoneuronas, que van a inervar a los músculos esqueléticos. Las motoneuronas se encuentran en la médula espinal y tronco encefálico, organizadas en núcleos motores. Un grupo de motoneuronas que inervan un mismo músculo se organizan en un núcleo motor en la médula espinal ventral, cuya salida se da por la raíz ventral (Pearson & Gordon, 2000).

Control motor: CGP espinales.

Los Generadores de Patrones Centrales (CGP, *por Central Pattern Generators*) son redes neuronales en el sistema nervioso central capaces de producir actividad rítmica, generando una salida motora que no implica un esfuerzo consciente, y reguladas por retroalimentación sensorial (Mortin & Stein, 1989; MacKay-Lyons, 2002). En vertebrados se han identificado distintos CGP's espinales, por ejemplo los responsables del nado, el rascado y la marcha (Mortin & Stein, 1989). La capacidad rítmica del CGP que controla el movimiento de los miembros inferiores consta de múltiples núcleos, distribuidos ventralmente en la médula espinal a lo largo del ensanchamiento lumbar (Kiehn, 2006).

El estudio de lesiones espinales en modelos animales sugiere un control locomotor tripartito. Éste consta de un componente medular -el centro generador de patrones (CGP)- cuya actividad como ya se ha mencionado es rítmica. Un segundo componente son las aferencias sensoriales, las que influyen en forma fásica el CGP, ayudando a que la salida motora se adapte a un ambiente cambiante. El tercer componente involucrado en el control locomotor son las vías descendentes del tronco encefálico y telencéfalo, que entre otras funciones realizan la neuromodulación de los circuitos espinales (Rossignol et al. 2007).

El generador de patrones centrales implicado en el acto locomotor es quien integra las funciones de ritmicidad, coordinación ipsilateral de músculos flexores y extensores, y coordinación derecha-izquierda (Kiehn, 2006).

Las áreas supra-espinales cumplen cinco funciones principales: activar los CGPs, regular la intensidad de la actividad de los CGPs, el mantenimiento del equilibrio (control postural) durante la locomoción, la adaptación del movimiento a las condiciones externas, y la coordinación de la locomoción con otros actos motores (MacKay-Lyons, 2002).

A su vez, los patrones motores producidos por los CGPs son modificados por neuromoduladores, que van a facilitar, deprimir, o iniciar la actividad motora mediante la modificación de las propiedades intrínsecas y sinápticas de las neuronas (MacKay-Lyons, 2001).

Neuromodulación de la locomoción.

La neuromodulación de los circuitos permite al organismo una amplia flexibilidad del comportamiento desplegado, integrando en forma adecuada el entorno en que se encuentra, el diagramado de los circuitos neuronales, y la composición biomecánica del organismo (Marder, 2012).

Múltiples sustancias pueden actuar como neuromoduladoras de un circuito, como fue estudiado en el ganglio estomato-gástrico (STG) de crustáceos, que es un circuito CGP que contiene un número aproximado de 30 neuronas (Marder, 2012). Cuando se corta la inervación aferente del STG se enlentece o incluso interrumpe la alta frecuencia de descarga de las neuronas del STG. Ésta frecuencia puede ser obtenida nuevamente si se introducen exógenamente diversas sustancias neuromoduladoras como ser dopamina, proctolina y serotonina (Marder, 2012). Este trabajo muestra de forma experimental cómo determinadas sustancias pueden actuar como neuromoduladoras, reconfigurando un circuito neural pre-existente.

Los CGPs que subyacen diversas conductas en vertebrados se localizan en la médula espinal (Mortin & Stein, 1989). En la tortuga de agua dulce *Trachemys scripta elegans* se han identificado tres tipos de reflejos de rascado (*scratch reflex*), donde cada uno posee un patrón motor estereotipado característico, muchas veces con interneuronas en común (Mortin & Stein, 1989). En estudios previos sobre crustáceos, se identificó que los neuromoduladores activaban distintas conexiones entre interneuronas del CGP para generar distintos patrones motores (Mortin & Stein, 1989).

La serotonina como neurotransmisor en el Sistema Nervioso Central (SNC)

La 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) es un efector en diversos tipos de músculo liso, fomenta la agregación plaquetaria, y por sobre todo es uno de los principales neurotransmisores del SNC (Frazer & Hensler, 1999).

Sistema serotoninérgico como neuromodulador de los circuitos motores

La aplicación exógena de sustancias neuromoduladoras permite estudiar la respuesta de los circuitos neuronales (Marder, 2012). En estudios realizados en la médula espinal aislada de lampreas, se identificó a la serotonina endógena como participante en la regulación del ritmo del CGP para producir movimientos adaptados a las necesidades del animal (Harris-Warrick & Cohen, 1985). La serotonina liberada en momentos específicos y en determinados sitios de la médula espinal, podría ser el neuromodulador utilizado para afinar el programa motor generado por el CGP (Harris-Warrick & Cohen, 1985).

En el SNC de los mamíferos, las células serotoninérgicas se encuentran agrupadas en nueve núcleos principales, distribuidos en la línea media o rafe de la protuberancia y tallo encefálico (Bloom, 2006). La innervación serotoninérgica proviene así desde centros supraespinales (Ghosh & Pearse, 2015). A su vez, estudios con embriones de ratones utilizando cultivos organotípicos de médula espinal aislada, se demostró que existe una aparición de neuronas intraespinales serotoninérgicas, proceso que estaría siendo inhibido por señales supraespinales en situaciones control (Branchereau et al, 2002).

Síntesis y metabolismo

La 5-HT es una molécula hidrofílica que no atraviesa la barrera hematoencefálica. La molécula de 5-HT se sintetiza a partir del aminoácido esencial triptófano, se almacena en gránulos secretorios gracias a un transportador vesicular, y la liberación se da por exocitosis. En el sistema nervioso, la 5-HT liberada puede ser re-captada por un transportador específico (SERT). El transportador de 5-HT se encuentra localizado en la membrana exterior de las terminaciones axónicas serotoninérgicas. La vía metabólica principal de la 5-HT abarca a la enzima mitocondrial monoaminoxidasa (MAO) (Westfall & Westfall, 2006), y también puede ser incorporada a las vesículas sinápticas por el transportador vesicular VMAT.

La síntesis de serotonina puede ser aumentada en respuesta a una estimulación eléctrica del soma de la célula serotoninérgica en una manera que depende de la frecuencia de estimulación (Frazer & Hensler, Goodman & Gilman: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects, 2006).

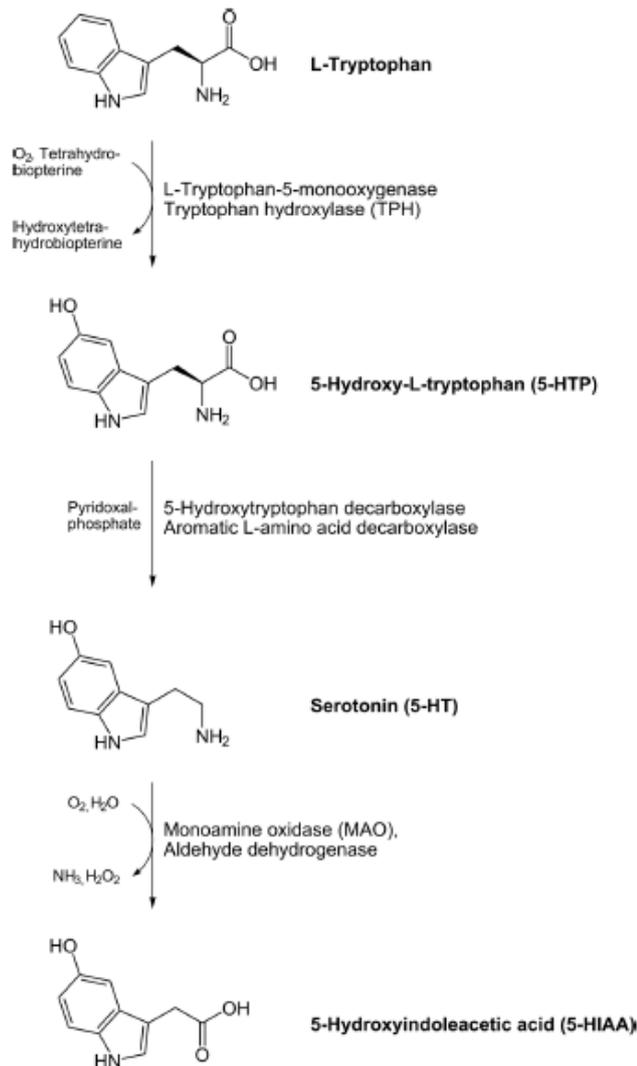


Figura 1 Síntesis e inactivación de la serotonina. Tomado de Bortolato et al, 2013.

La serotonina promueve la neurogénesis y la plasticidad neuronal en el SNC inmaduro, y es responsable de mantener el fenotipo neural en el cerebro maduro (Branchereau et al, 2002).

Lesión de la médula espinal

La lesión de la médula espinal en los mamíferos lleva a una pérdida irreversible de actividad motora y sensorial. Los mecanismos celulares que subyacen una lesión medular implican la muerte de células como ser neuronas, oligodendrocitos y astrocitos, así como también a la interrupción de haces de axones ascendentes y descendentes (Thuret et al, 2006).

Pacientes con lesiones medulares completas muestran una pérdida de las funciones motoras, sensitivas y pérdida del control voluntario de las funciones de los esfínteres rectal y de la vejiga. En el caso que la lesión se produzca a nivel cervical, los centros respiratorios también van a ser afectados (Pearson & Gordon, 2000). En humanos, lo más frecuente es ver traumatismos de la médula espinal, que a pesar de no ser una lesión completa resulta en la disrupción de las conexiones presentes entre la red neuronal espinal, las supraespinales y de aferencias sensoriales, dando como consecuencia una función locomotora deteriorada (Ghosh & Pearse, 2015). Dicho impedimento sería irreversible ya que el sistema nervioso central en los humanos no tiene la capacidad de reparación endógena (Ghosh & Pearse, 2015).

En estudios realizados sobre embriones tempranos de pollo se constató que existe una capacidad limitada de regeneración axonal como producto de una lesión medular. Esta capacidad se evidencia durante una ventana temporal crítica en el desarrollo temprano de los embriones, y se pierde a medida que la edad del animal aumenta (Coumans et al 2001). Sin embargo en algunos vertebrados inferiores como la tortuga de agua dulce, se genera un puente celular que reconecta los muñones rostral y caudal de la médula lesionada, contribuyendo a una recuperación parcial de la actividad sensorio-motriz (Rehermann et al 2009).

La rehabilitación luego de una lesión parcial de la médula espinal debe priorizar el entrenamiento locomotor utilizando mecanismos que refuercen tanto el control voluntario como el potenciamiento de mecanismos espinales endógenos (Rossignol et al. 2007). Una aproximación en este sentido ha sido la utilizada por Antri et al (2002), quienes luego de realizada una lesión de médula espinal en ratones lograron la recuperación de la actividad motora tras la inyección del agonista de receptores 5-HT₂, quipazina. La hipótesis manejada por estos investigadores consiste en un efecto modulador a largo plazo de la serotonina. El tratamiento crónico con inyecciones

diarias de quipazina mostró una recuperación progresiva de las funciones locomotoras, que es interrumpida una vez que se interrumpe la administración del agonista (Antri et al. 2002). Al utilizar un agonista 5-HT_{1A}, 8-OHDPAT (8-hydroxy-(2-di-N-propylamino) tetralin), obtuvieron nuevamente una recuperación de la actividad motora, pero cuya acción sobre la médula espinal implica tanto mecanismos a largo como a corto plazo (Antri et al. 2003).

Numerosos estudios han probado que la manipulación farmacológica de los segmentos medulares aislados por una lesión completa posibilita una reorganización funcional de los circuitos espinales. De esta manera se ha logrado inducir la locomoción en gatos espinalizados mediante la acción conjunta de agonistas del receptor NMDA y el aumento del nivel de serotonina o noradrenalina (Bradbury y McMahon, 2009).

Además de regular funciones cerebrales superiores, las monoaminas tienen una fuerte influencia sobre los reflejos espinales y la actividad motora en vertebrados (Kiehn et al. 1992). También se encontró que la transmisión monoaminérgica puede inducir cambios en las propiedades de membrana, tanto en motoneuronas espinales de gatos espinalizados, como en motoneuronas de preparados in vitro de médula espinal de tortugas (Kiehn et al. 1992; Perrier & Cotel, 2008). La serotonina ejerce estas acciones actuando sobre dos tipos de receptores 5-HT, localizados en regiones distintas de la motoneurona. Por un lado, la serotonina actúa sobre los receptores 5-HT₂ que se expresan en la membrana somato-dendrítica, promoviendo potenciales *plateau*, aumentando así la excitabilidad de la neurona (Kiehn et al. 1992; Perrier & Cotel, 2008). Por otro lado, la serotonina tiene un efecto inhibitorio al actuar sobre los receptores 5-HT_{1A/7} expresados en la región perisomática de la motoneurona (Perrier & Cotel, 2008; Perrier, 2015).

La liberación de serotonina durante los movimientos musculares moderados va a facilitar la contracción muscular mediante modulación de la actividad de las motoneuronas. Estudios realizados en gatos demuestran una correlación entre la frecuencia de disparo de neuronas del rafe, con la intensidad de la actividad motora realizada. Durante la locomoción activa, las frecuencias de disparo de las neuronas del rafe aumentan en paralelo con la intensidad del ejercicio, mostrando que hay una relación entre la cantidad de serotonina liberada y la frecuencia de disparo de las motoneuronas, y por lo tanto del movimiento (Perrier, 2015).

En actividades musculares intensas, se da la liberación de más serotonina, saturándose el mecanismo de recaptación de serotonina. Los altos niveles de serotonina extracelular permiten la activación de los receptores 5-HT_{1A} dispuestos en el segmento axonal inicial, que van a inhibir el disparo de las motoneuronas. De esta manera se inhibe la contracción muscular, pudiendo ser así un mecanismo celular de fatiga generado en el sistema nervioso (Perrier, 2016).

Plasticidad y reparación del sistema nervioso

Frente a una lesión del sistema nervioso, como por ejemplo la sección completa de la médula espinal, se dispararán mecanismos de plasticidad y reparación, que contienen elementos en común a los utilizados durante la formación de nuevas neuronas.

Hoy en día se conoce que en el cerebro adulto de mamíferos existen nichos donde residen progenitores neurales, células capaces de formar nuevas neuronas. La neurogénesis en mamíferos adultos se ha demostrado en la zona subventricular y la zona subgranular del giro dentado en el hipocampo y se ha propuesto en algunas áreas corticales y en la sustancia negra (Arias-Carrion, et al. 2007; Arias-Carrion & Drucker-Colín, 2007).

Algunas evidencias indicarían que la capacidad neurogénica estaría dada por la conservación en el cerebro adulto de un microambiente en el que residen las células desde el desarrollo embrionario y posnatal (Arias-Carrion, et al. 2007).

La lesión completa de médula espinal, corta los axones provenientes de centros supraespinales, interrumpiendo entre otras la vía serotoninérgica descendente. La interrupción de la vía serotoninérgica provoca una disminución de la tasa de proliferación celular en el hipocampo de ratas (Arias-Carrion, et al. 2007).

El canal central (CC) es -en vertebrados inferiores como la tortuga- un nicho de células madre- que participa organizando la re-conexión de la médula luego de la lesión (Fernández et al., 2002; Russo et al., 2004; Russo et al., 2008). Se postula que el epéndimo de la médula espinal de mamíferos contiene neuronas inmaduras en contacto con el CC con propiedades similares a las observadas en los nichos neurogénicos de vertebrados inferiores (Marichal et al. 2009). De esta manera, el CC

estaría representando una fuente de plasticidad que activada por la lesión soporta la reconexión de la médula espinal contribuyendo a cierta recuperación funcional.

Luego de la lesión espinal en la tortuga, en un primer momento se da la formación de un coágulo en el sitio de la injuria. Este coágulo inicial es la primera conexión física entre los recién separados muñones espinales. A las 28 horas luego de la lesión, no se encontraron axones ni procesos gliales, pero sí terminaciones bulbosas distróficas en el epicentro de la lesión (Rehermann et al. 2009). Entre 7 y 15 días luego de realizada la lesión de la médula espinal, el coágulo es substituido por un puente celular. Estudios posteriores demostraron un aumento de la proliferación celular hacia ambos lados del epicentro de la lesión (Rehermann et al. 2009). A su vez, a los 7 días de realizada la lesión se observó la presencia de células y fibras serotoninérgicas alrededor de la zona lesionada, se encontraron terminales axónicas que expresaban 5-HT en el epicentro de la lesión (Rehermann et al. 2009).

Estudios preliminares en nuestro laboratorio han mostrado un aparente aumento en el número de células serotoninérgicas en el ensanchamiento lumbar de tortugas lesionadas. Estas células se encontraron próximas al canal central (CC), región previamente reconocida como sitio con propiedades neurogénicas en la tortuga (Fernández et al., 2002; Rehermann et al. 2012).

Linaje celular de las células 5-HT+

Uno de los mecanismos implicados en la recuperación funcional de la médula espinal en la tortuga podría ser la plasticidad del sistema serotoninérgico por debajo de la lesión.

Buscamos investigar de forma preliminar el linaje de las células 5-HT+ encontradas en la medula espinal lumbar de la tortuga. Comenzamos por analizar la expresión del marcador de neuronas inmaduras HuC/D. Luego realizamos inmunomarcado con anticuerpos anti Nkx6.1, factores de transcripción de neuronas serotoninérgicas. Utilizamos el marcador del factor de transcripción Nkx6.1 ya que es uno de los factores de transcripción que está involucrado en la génesis de neuronas serotoninérgicas.

Mecanismos de plasticidad fenotípica

Estudios recientes indican que una disminución en la actividad celular, por ejemplo por lesión, da un aumento de los neurotransmisores excitatorios y una disminución de los neurotransmisores inhibitorios (Dulcis y Spitzer, 2012).

Estos estudios han aportado evidencias de la posibilidad de reconfiguración del neurotransmisor expresado mediante un cambio en la actividad eléctrica de la neurona (Borodinsky et al. 2004; Dulcis y Spitzer, 2012). En efecto, en embriones de *Xenopus laevis* se comprobó que la manipulación de los patrones de espigas de calcio específicas de las distintas clases de neuronas espinales embrionarias cambia el fenotipo neuroquímico de la neurona. La supresión de las espigas de calcio provoca el aumento de la expresión de neurotransmisores excitatorios, y la disminución de neurotransmisores inhibitorios. De la misma manera, el aumento de la descarga de espigas de calcio provoca la supresión de la señal de neurotransmisores excitatorios y un aumento de la expresión de neurotransmisores inhibitorios (Borodinsky et al. 2004).

Basándome en estos trabajos se podría de esperar un mayor número de neuronas serotoninérgicas luego de realizado el completo seccionamiento de la médula espinal de la tortuga.

Hipótesis de trabajo

La hipótesis de trabajo es que frente a la lesión existe un cambio plástico en la innervación serotoninérgica por debajo de la lesión con el fin de compensar la modulación por serotonina de los circuitos espinales. Como corolario de esta hipótesis central, especulamos que los progenitores del CC podrían proliferar generando nuevas neuronas serotoninérgicas. Una posibilidad alternativa es que la aparición de nuevas neuronas serotoninérgicas sea debido a un cambio fenotípico de neuronas pre-existentes desencadenado por la interrupción de las fibras descendentes serotoninérgicas luego de la lesión.

Objetivos

- Como primer objetivo nos propusimos cuantificar el cambio en el número de células serotoninérgicas en la médula espinal lumbar de tortugas lesionadas con respecto a tortugas control.
- Como segundo objetivo nos propusimos estudiar los mecanismos subyacentes a la aparición de nuevas células serotoninérgicas. En otras palabras, ¿las células serotoninérgicas encontradas en las tortugas lesionadas se generan por neurogénesis o responden a un cambio fenotípico de células preexistentes? Un mecanismo de neurogénesis sería evidenciado por mayor número de células BrdU+ co-localizando serotonina, mientras que un cambio fenotípico mostraría que las nuevas células serotoninérgicas no incorporan BrdU.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron tortugas de agua dulce juveniles (4 a 12 meses de edad) *Trachemys scripta elegans*, de 5-6 cm de largo, y 10-15g de peso provenientes de Louisiana Turtle Farm (USA). Las tortugas fueron mantenidas en un acuario a temperatura estable de 28°C, expuestas a luz natural y artificial, alimentadas dos veces por semana. Los protocolos utilizados, así como las condiciones del bioterio han sido previamente aprobados por la CNEA (Comisión Nacional de Experimentación Animal).

La ventaja que plantea el uso de *T. scripta elegans* como modelo de experimentación es su capacidad de regeneración de la médula espinal luego de una lesión (Rehermann et al. 2009; Rehermann et al. 2011). Otras ventajas que presenta como modelo son su fácil mantenimiento en un bioterio y posibilidad de realizar estudios con gran número de individuos de una misma edad ya que pueden ser obtenidas de granjas de cría de tortugas.

Para el presente trabajo se utilizó un total de 16 tortugas lesionadas y 12 tortugas lesionadas en forma ficticia como controles.

Lesiones

Las lesiones fueron realizadas por investigadores acreditados, y protocolos aprobados por la CNEA. Para la realización de las lesiones se siguió el protocolo descrito por Rehermann et. al. (2009).

Para la lesión de la médula se anestesió al animal mediante una inyección intraperitoneal de Ketamina (40mg/kg, i.p.), e inhalación de isofluorano (1-chloro-2,2,2-trifluoroethyl difluoromethyl ether; Terrell, Laboratorio LIBRA, Uruguay).

El uso de anestésicos al momento de realizar una operación garantiza que el animal permanezca en la misma posición durante la intervención, facilitando la manipulación durante la intervención quirúrgica.

La ketamina es un agente anestésico disociativo, comúnmente utilizado en la práctica veterinaria, incluyendo en reptiles. La dosis utilizada es de 40mg/kg vía de administración intraperitoneal (Figura 2) (Rehermann et. al., 2009; Rehermann et. al.,

2011). Éste analgésico fue combinado con la inhalación de isoflurano al 1% durante el transcurso de la cirugía (Rehermann et. al., 2009; Rehermann et. al., 2011), ya que ayuda a mantener el estado de anestesia inducido por la ketamina (Bennett, 1991). Cuando el animal estaba profundamente anestesiado (no responde a estímulos nociceptivos) se procedió a asegurarlo a un soporte rígido.

Todo el material quirúrgico utilizado fue previamente esterilizado y se pasó alcohol iodado por el caparazón del animal con el fin de evitar posibles infecciones. Bajo lupa se procedió a abrir una pequeña ventana en la unión de la tercera y la cuarta placa dorsal del caparazón para exponer la médula espinal. Una vez expuesta la médula se realizó un corte transversal, seccionando completamente la médula espinal a nivel torácico (Figura 2). Posteriormente se volvió a colocar la placa levantada y se la selló con cianoacrilato (2-cianoacrilato de Etilo; Rehermann et. al., 2009). Finalizada la intervención quirúrgica los animales fueron colocados a temperaturas cálidas, permitiendo que eleven su temperatura corporal (Berkowitz et al, 1994; Rehermann et. al., 2009), para luego ser introducidos en el acuario. Una vez que las tortugas se recuperaron de la intervención quirúrgica, aproximadamente 4 horas más tarde, todas las tortugas fueron sometidas a un control conductual, donde se descartaron todas aquellas que movían alguno o ambos miembros posteriores.

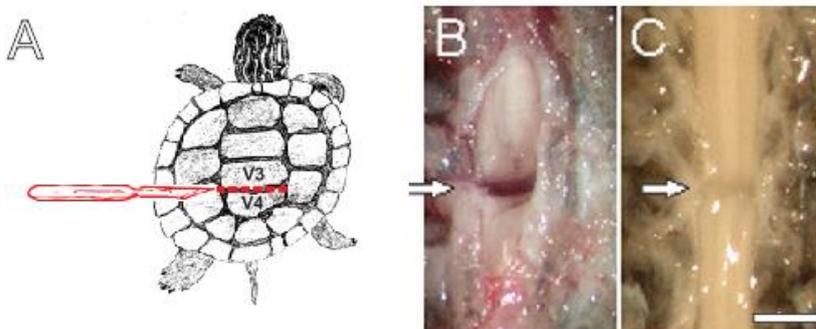


Figura 2. Lesión de la médula espinal. **2A_** Esquema de la lesión de médula espinal a nivel de la tercera placa (V3), el bisturí indica el lugar de la lesión. **2B_** Fotografía de la médula espinal al momento de la lesión, la flecha indica el corte realizado. **2C_** Fotografía de la disección de la médula espinal 30 días luego de la lesión. La flecha indica la región donde se realizó la lesión medular. Escala= 500µm.

Lesión ficticia (LF)

Los animales control fueron sujetos a una lesión ficticia, esto es, se realizó el protocolo detallado anteriormente pero con la salvedad de que una vez descubierta la médula espinal, no se lesionó la médula, y se cerró el caparazón.

Cuidados Postoperatorios

Las tortugas no requieren de cuidados postoperatorios especiales (Rehermann et al, 2009).

Evaluación in vivo de la lesión

Para confirmar in vivo que la lesión se realizó completamente, se estudia la respuesta motora refleja frente al pinzado de la cola. Al pinzar suavemente la cola de la tortuga con una pinza gruesa se identificó una respuesta característica en lesiones medulares, que consiste en un movimiento reflejo motor donde se da la aducción rápida de los miembros posteriores y luego una lenta abducción y extensión. Este reflejo característico fue descrito anteriormente por Rehermann y col. (Rehermann et al. 2009).

Registro de la actividad motora

Registramos en formato de video la actividad motora de las tortugas lesionadas para el posterior análisis cinemático que nos permite evaluar una eventual recuperación funcional los miembros posteriores (Rehermann et al. 2009).

Un segundo ensayo fue realizado disponiendo a las tortugas sobre una superficie plana antideslizante. Las tortugas LF demostraron un despliegue locomotor normal, mientras que las lesionadas arrastraron el cuerpo sobre la superficie usando las extremidades anteriores, manteniendo las extremidades posteriores retraídas bajo el caparazón y en otros casos extendidas sobre la superficie (Rehermann et al., 2009). Finalmente, se estudiaron los patrones locomotores exhibidos por las tortugas durante el nado libre. Nuevamente se encontraron diferencias entre tortugas lesionadas, donde algunas mantuvieron los miembros posteriores retraídos mientras que otras mantuvieron los miembros posteriores extendidos.

Para cumplir con el **segundo objetivo** hicimos un protocolo de inyección in vivo de BrdU, y un posterior análisis inmunohistoquímico conjugando anticuerpos anti BrdU y anti 5-HT. Se utilizaron 6 ejemplares lesionados y 6 LF, todos ellos fueron perfundidos a los 30 días luego de la lesión (30 dpl).

Inyecciones de BrdU

El bromodeoxiuridina (BrdU) es un marcador de la proliferación celular, análogo de la timidina, que se incorpora durante la fase S del ciclo celular. La aplicación de este marcador nos revela las células que han sufrido al menos un ciclo de división celular. Se realizaron dos protocolos de inyección de BrdU por saturación, donde cada uno consta de 2 inyecciones diarias de BrdU (150mg/kg) durante cuatro días, comenzando en un grupo a las 24h luego de la lesión (n lesionadas= 3; n LF= 3), y otro grupo comenzando el octavo día luego de la lesión (n lesionadas= 3; n LF= 3) (Figura 3). El volumen de solución de BrdU a inyectar fue cuidadosamente establecido ya que incrementa la posibilidad de formación de edemas y retención de líquidos. Las inyecciones de BrdU en la primera semana marcarán aquellas células que comienzan a dividirse tempranamente, antes del cuarto día post lesión. Las inyecciones en la segunda semana marcarán aquellas células que comienzan a dividirse en una etapa más tardía, entre el octavo y decimoprimer día luego de la lesión. Luego de transcurridos 30 días de realizada la lesión medular ó la lesión ficticia las tortugas fueron perfundidas y se procedió al procesamiento del tejido para inmunohistoquímica.

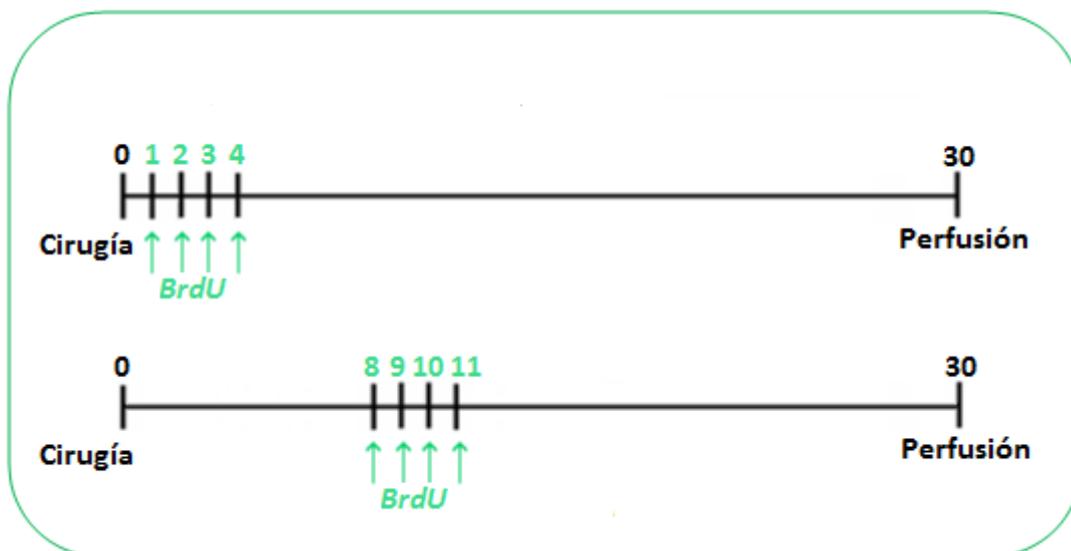


Figura 3. Diseño del análisis de proliferación celular.

Perfusión y fijación del material biológico

El total de animales utilizados se separó en dos grupos, según el tiempo de sobrevida, unos 10 días post lesión (10 dpl), y un segundo grupo de 30 días post lesión (30 dpl), según el diseño experimental. Luego de transcurridos los tiempos de sobrevida, se realizó la eutanasia de los animales, y fijación de la médula espinal para su ulterior procesamiento por inmunohistoquímica.

La ventana temporal de sobrevida utilizada se debe a que los animales son objeto de investigaciones de parte del equipo del laboratorio, donde se estudia el epicentro de la lesión (Rehermann et.al, 2009). Es en busca de reducir el número de animales utilizados es que se opta por evaluar la respuesta serotoninérgica frente a una lesión de médula 30 días post lesión. Debe de destacarse que en la bibliografía está documentado que las primeras señales de recuperación motora aparecen luego de transcurridos 20 días de la lesión (Rehermann et al 2009), validando entonces una evaluación celular del tejido a los 30 días. Se utilizaron a su vez animales de 10 días post lesión para estudiar cómo es que se da la respuesta temprana a la lesión.

El anestésico utilizado en la eutanasia de las tortugas fue el pentobarbital, seguido por perfusión intracardíaca con salino y paraformaldehído al 10% en Ringer de tortuga (Rehermann et. al., 2009). El pentobarbital es un fármaco de la familia de los barbitúricos que empleado en reptiles a dosis de entre 60-100 mg/kg producen la muerte del animal, método no inhalatorio de eutanasia que posee el aval de guía AVMA para la eutanasia de animales, edición 2013.

La perfusión intracardíaca se realizó una vez que se confirmó, mediante la valoración de respuestas nociceptivas, que el animal estaba inconciente. En un primer momento se inyectó una solución salina ó Ringer de tortuga para quitar la sangre del sistema circulatorio, y posteriormente se pasó al fijado del organismo mediante el paso de una solución fijadora que contiene paraformaldehído al 10% (Rehermann et. al., 2009), diluida en un volumen de Ringer de tortuga.

Luego de la fijación, se procedió a la disección de la médula espinal para su inclusión en un bloque compuesto de albúmina y gelatina en relación 2:1 (albúmina al 40%, gelatina al 1,5%), y dos gotas de glutaraldehído (72µl).

Inmunohistoquímica

Para cumplir los objetivos de este trabajo se analizó la región del ensanchamiento lumbar de la médula espinal. Se utilizó un vibrátomo para obtener secciones transversales de la médula espinal de 70µm de espesor. Cada tortuga es considerada una unidad muestral independiente, mientras que los cortes analizados de una misma tortuga constituyen una pseudo réplica. El analizar un mayor número de pseudo réplicas permite aumentar la significancia estadística, sin la necesidad de aumentar el número de animales utilizados.

Una vez obtenidas las secciones se realizaron reiterados lavados con buffer fosfato (PB, pH 7.4) para limpiar posibles impurezas. Luego fueron incubadas con los anticuerpos primarios diluidos en PB tritón al 0,3% durante 48 horas. En última instancia las secciones fueron incubadas con los anticuerpos secundarios, conjugados a un fluoróforo. Los preparados histológicos obtenidos de esta forma fueron analizados utilizando el microscopio confocal Olympus VF300 y el programa Fluoview 5 del IIBCE, en donde se tomaron a su vez las fotografías del presente trabajo.

Las técnicas inmunohistoquímicas anti 5-HT se realizaron sobre un total de 15 tortugas. Éstas se separaron en dos grupos de tortugas lesionadas con tiempos de sobrevida distintos, uno a los 10 días luego de la lesión (10dpl n=3), otro a los 30 días (30dpl n=6), y tortugas LF (LF n=6).

BrdU y 5-HT

El ADN conteniendo BrdU puede ser detectado por inmunohistoquímica (Nowakowski et al. 1989). El uso de anticuerpos anti BrdU requiere un previo tratamiento de los cortes con HCl (40 minutos) y posteriores lavados, para obtener una mejor señal. Los cortes se incubaron con anticuerpo primario anti serotonina (generado en conejo) y anti BrdU (generado en ratón). Luego de pasadas 48 horas de incubación del anticuerpo primario se lavaron los cortes y se los incubó para ser revelados durante 90 minutos con los anticuerpos secundarios anti-conejo conjugado con fluoróforo (Alexa 488) y anti-ratón conjugado con fluoroforo (Alexa 633).

Los cortes fueron montados en glicerina y luego observados en el microscopio confocal (OlympusVF300). Las imágenes se obtuvieron con el programa Fluoview5 (Olympus).

Estudios preliminares del linaje celular de las células 5-HT+

Yendo un poco más allá de los objetivos específicos de este trabajo estudiamos la co-localización celular de la serotonina con el factor de transcripción Nkx6.1 y con el marcador de neuronas HuC/D. Para esto se seleccionaron los fluoróforos adecuados para la detección simultánea sin solapamientos espectrales. Se utilizaron secciones del ensanchamiento lumbar de tortugas LF y tortugas lesionadas 30dpl.

Cuantificación de células BrdU+

Al igual que para las células 5-HT+, se realizó una cuantificación de las células BrdU+. Se buscó en forma activa células doble marcadas para el BrdU y 5-HT.

Análisis estadístico

Cumpliendo con el primer objetivo se contaron todas las neuronas 5-HT+ presentes en 10 secciones de 70µm de espesor, correspondientes al ensanchamiento lumbar de cada tortuga.

Para el segundo objetivo se contó en número de núcleos BrdU+ localizados en un área de 32000µm² alrededor del CC, en 5 cortes correspondientes al ensanchamiento lumbar. Esto se realizó con los dos grupos de tortugas lesionadas y control, con el protocolo de inyección de BrdU a distinto tiempo.

Se aplicó el test no paramétrico "U" de Mann-Whitney con un $P < 0.05$, para obtener el valor estadístico de los datos analizados.

RESULTADOS

Evaluación de la recuperación de la locomoción luego de la lesión

Todas las tortugas utilizadas fueron sometidas a ensayos para registrar la actividad motora. El 20% de las tortugas lesionadas exhibieron algún tipo de recuperación motora de los miembros inferiores a tiempos de sobrevivencia cercano a los 30 días post lesión. El ensayo de nado libre mostró que estas tortugas mantenían sólo uno de los miembros posteriores extendido, mientras que las restantes tortugas que no evidenciaban una recuperación funcional mantenían las extremidades posteriores retraídas por debajo del caparazón. La estimulación sobre una superficie plana en el segundo ensayo provocó la retracción de los miembros posteriores en aquellas tortugas que mantenían un miembro extendido. En todas las tortugas evaluadas se vio un desplazamiento activo realizado utilizando sus miembros anteriores.

Distribución de células y fibras 5-HT+ en tortugas LF

Se estudió la distribución de cuerpos celulares y fibras de células serotoninérgicas (5-HT+) en el ensanchamiento lumbar de la médula espinal de la tortuga. En una primera etapa se analizó la distribución de dichas células en tortugas LF, (grupo control). Encontramos una población densa de terminales serotoninérgicos en toda la sección, con concentraciones mayores en el asta ventral, muchas veces rodeando las motoneuronas (Figura 4, A). Las terminales serotoninérgicas son de pequeño diámetro, bulbosas, y se disponen en forma de collar de cuentas sobre las fibras. Por otro lado, se encontraron pocas células 5-HT+ en la médula espinal (Figura 4, B y C), como fue descrito en estudios anteriores (Branchereau et al., 2002). Estos resultados van en concordancia con los antecedentes bibliográficos, donde Kiehn et al. (1992), trabajando con la tortuga *Trachemys scripta elegans* describen grandes formaciones de fibras 5-HT+ en la sustancia gris de los segmentos lumbo-sacros. Estos mismos autores describen también, tanto en el ensanchamiento cervical como en el lumbar, que el pericarion y los procesos de las motoneuronas son rodeados por terminales serotoninérgicas. A su vez, estos autores encontraron que hay células serotoninérgicas a todo lo largo de la médula espinal de la tortuga, con mayor abundancia de éstas en la región cervical y lumbo-sacra (Kiehn et al., 1992).

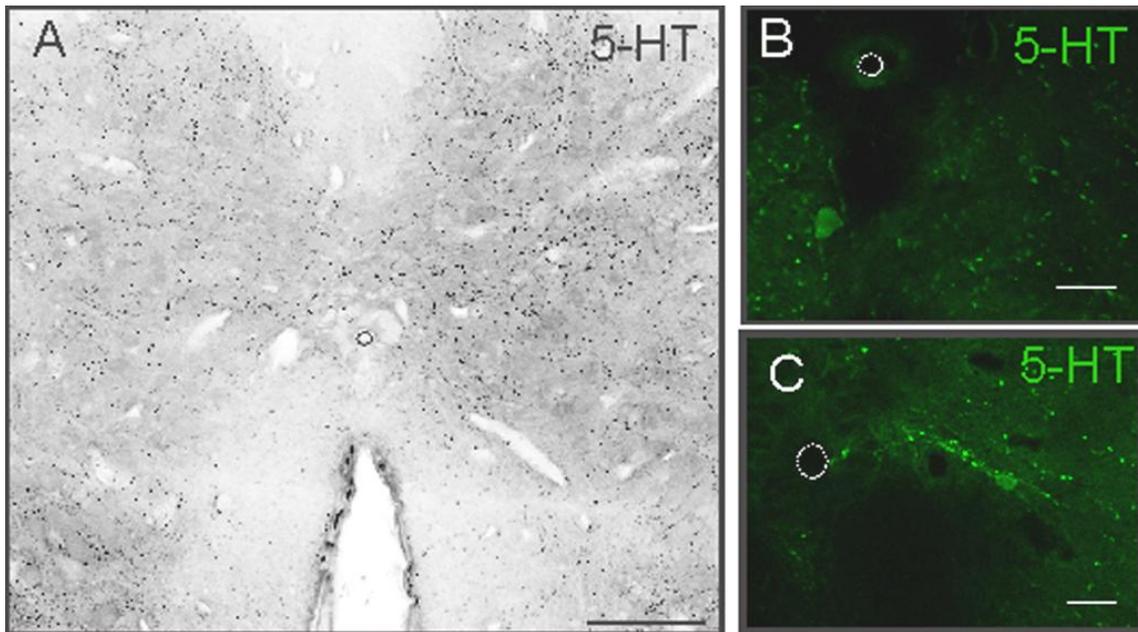


Figura 4. Médula espinal lumbar de tortuga LF, inmunomarcado para serotonina (5-HT). **A_** Imagen de inmunofluorescencia, invertida y en escala de grises. Botones serotoninérgicos y fibras varicosas. **B_** Célula serotoninérgica con proceso apical hacia el canal central. **C_** Procesos celulares y célula serotoninérgica proyectándose hacia el asta ventral. Escala A= 100 μ m; B y C= 20 μ m.

Distribución de células y fibras 5-HT+ en tortugas lesionadas

Para evaluar los sistemas de señalización serotoninérgicos intrínsecos, se debe estudiar la distribución de la serotonina en la médula espinal luego de una lesión completa de la médula, de forma de independizarse de las proyecciones monoaminérgicas descendentes (Rehermann et al. 2009, Kiehn et al. 1992).

Estudiamos el fenotipo de las células serotoninérgicas en la región lumbar de tortugas que habían sufrido una sección completa de la médula espinal. Luego de realizar la inmunohistoquímica para revelar las células 5-HT+ se procedió a un análisis con microscopía confocal. En las tortugas lesionadas encontramos una fuerte disminución de la población total de fibras y botones serotoninérgicos (Figura 5). Las terminaciones mantienen un tamaño similar a las encontradas en tortugas LF, pero las fibras tienen ahora una disposición “en passant”(Figura 5 B, B1). En cuanto al número de cuerpos celulares, vemos un aumento en el número de células serotoninérgicas respecto a tortugas LF, y largos procesos celulares (Figura 5B, B1). No se encontraron fibras varicosas.

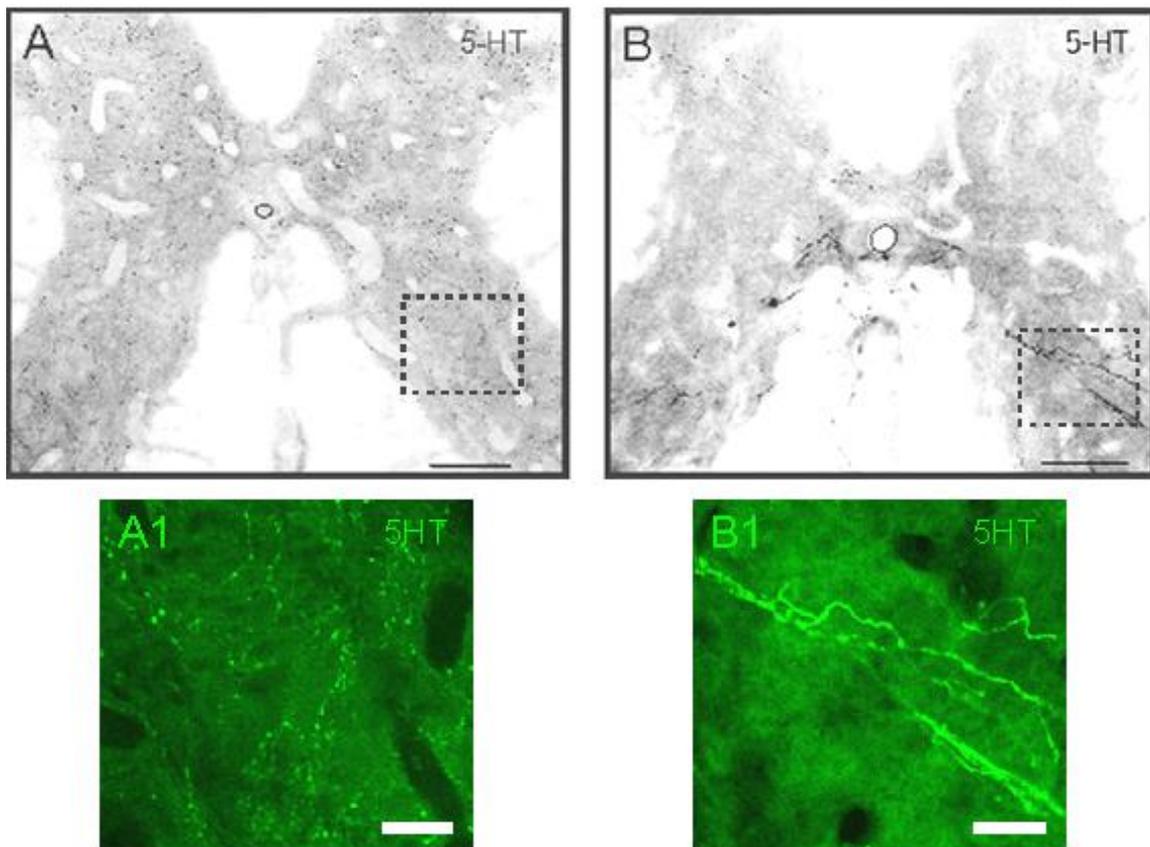


Figura 5. Inmunomarcado para serotonina (5-HT). A y B_ Imagen invertida y en escala de grises. Médula espinal lumbar de tortuga lesionada fijada a distintos tiempos post lesión. A_ Tortuga fijada a 10 dpl. B_ Tortuga fijada a 30 dpl. A1_ Ampliación del recuadro en A. Se muestran las fibras serotoninérgicas en su disposición similar a LF. B1_ Ampliación del recuadro en B. Se muestran las fibras serotoninérgicas en su disposición “en passant”. Escala A y B= 100 μ m; A1 y B1=30 μ m.

Tanto en tortugas LF como en lesionadas encontramos células bipolares 5-HT, localizadas ventromedialmente al canal central (CC), como fuera descrito por el grupo de Kiehn (Kiehn et al. 1992). Algunas células 5-HT+ localizadas en la región ventral del CC presentaron un proceso apical en contacto con la luz del canal (Fig. 6, A-C, E). Por otro lado, la mayor parte de las células encontradas en el ensanchamiento lumbar de la médula espinal corresponden a cuerpos celulares localizados ventromedialmente, con procesos que discurren hacia el CC (Fig. 6, D). Por último, se ha podido evidenciar el cuerpo celular serotoninérgico y sus gruesos procesos celulares discurriendo hacia el asta ventral (Fig. 6, F).

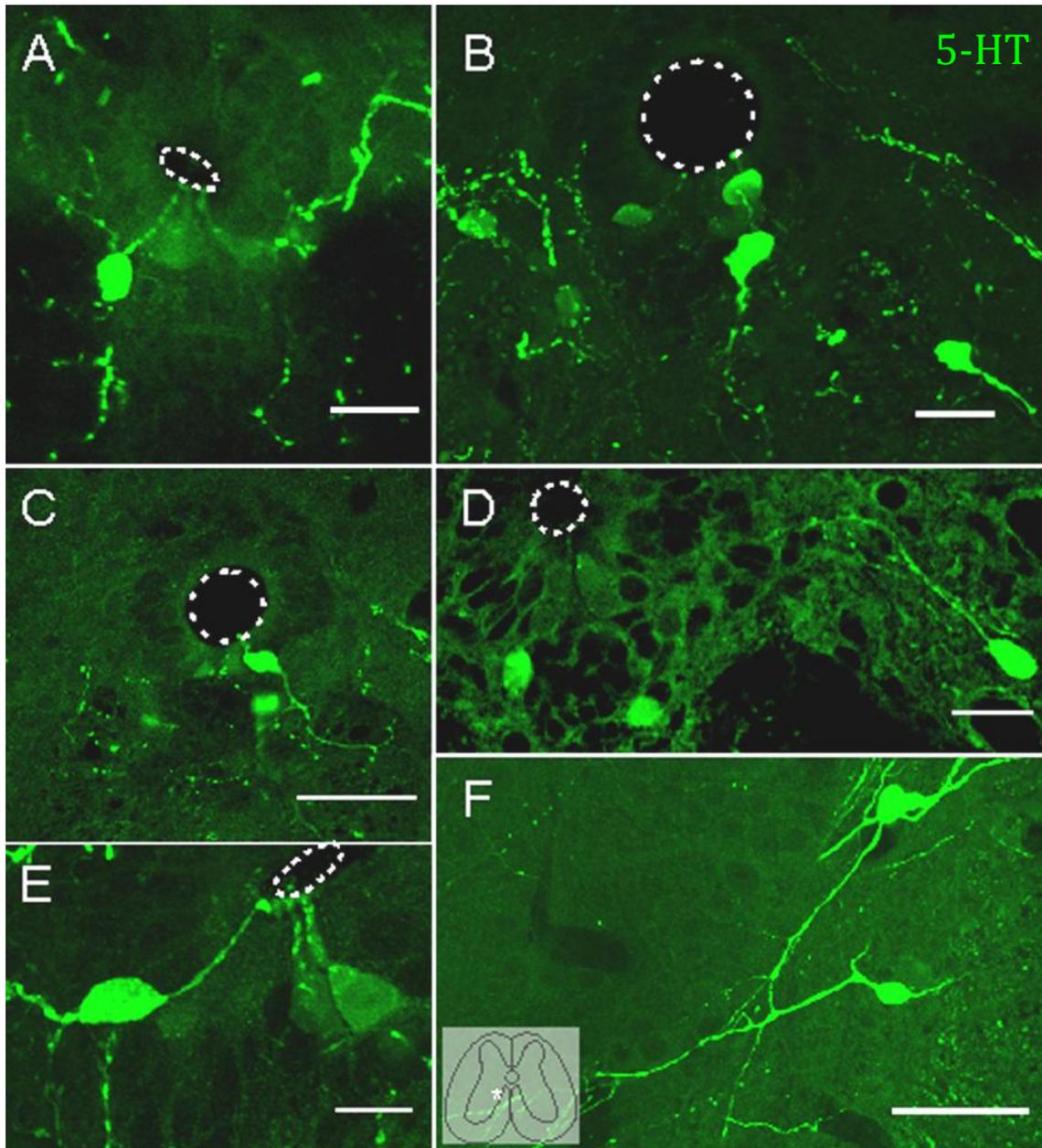


Figura 6. Inmunomarcado para serotonina en médula espinal de tortugas lesionadas 30dpl. Cuadro de los distintos tipos de células y procesos 5Ht+. **A, B, C y E**_ Células 5-HT+ con proceso apical en contacto con el CC. **D**_ Célula 5-HT+ con proceso apical hacia el CC, el cuerpo celular se orienta hacia el asta ventral. **F**_ Células y fibras 5-HT+ que discurren hacia el asta ventral. El asterisco en el esquema muestra la localización de estas células en la sección de médula espinal lumbar. Escala A, B y D= 20 μ m; C y F= 50 μ m; E= 10 μ m.

Cuantificación de las células 5-HT+ en la médula espinal de tortugas LF y lesionadas

Realizamos la cuantificación de células serotoninérgicas en secciones de la médula espinal de tortugas lesionadas y tortugas control.

En los segmentos del ensanchamiento lumbar constatamos un aumento de células positivas a la serotonina (5-HT+) en las tortugas lesionadas 30dpl. Esto está en línea con los resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio. Encontramos una tendencia al aumento en el número de células 5-HT+ en los grupos de tortugas lesionadas 30dpl (promedio de 69 ± 36 células 5-HT+ en 10 secciones) y 10dpl (promedio de 57 ± 24 células 5-HT+ en 10 secciones), respecto a las LF (promedio de 20 ± 11 células 5-HT+ en 10 secciones) (Figura 7). Se aplicó el test estadístico "U" de Mann-Whitney donde se constató una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de lesionadas L30dpl y LF (Figura 8, $p=0,029$). Por otro lado, se observó que el grupo de lesionadas 30dpl estaría sugiriendo un mayor número de células marcadas para la serotonina que el grupo 10dpl, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

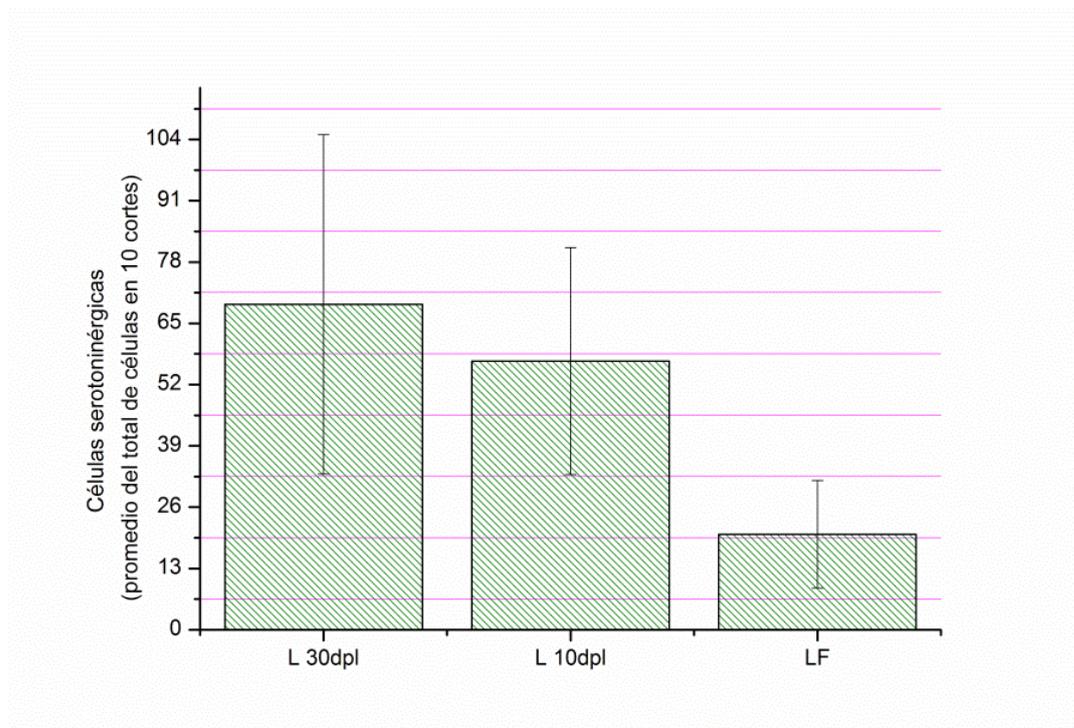


Figura 7. Gráfica del promedio del total de células 5-HT+ en 10 secciones a nivel del ensanchamiento lumbar. Se grafican a los distintos tiempos de sobrevida.

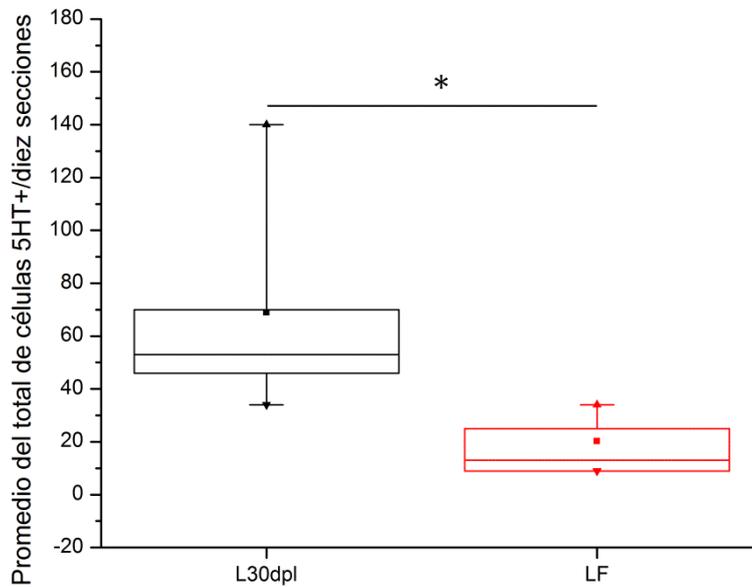


Figura 8. Gráfica del promedio del total de células 5-HT+ cada 10 secciones a nivel del ensanchamiento lumbar. La diferencia entre el grupo L30dpl y el grupo LF muestra ser estadísticamente significativa (*: $p < 0,05$). Rango: perc. 75,25 , — Mediana. Referencias: ■ promedio, — valor máximo, — valor mínimo, ▲ percentil 99, ▲ percentil 1.

Evaluación de la neurogénesis de células 5-HT+ luego de la lesión

En estudios previos de nuestro grupo, el empleo de del marcador de síntesis celular bromodeoxiuridina (BrdU) mostró un aumento de células BrdU+ en la región del epicentro de la lesión de la médula espinal, encontrándose una concentración mayor de células BrdU+ alrededor del CC (Rehermann et al. 2011). Esta diferencia con respecto al número de núcleos BrdU+ encontrados en tortugas LF mostraba disminuir a medida que se estudiaban regiones más distantes al epicentro, como ser a nivel cefálico ó lumbar (Rehermann et al. 2011). Para evaluar la posibilidad de que las nuevas células serotoninérgicas fueran generadas en este nicho neurogénico, nos propusimos realizar una doble marcación de serotonina y BrdU. Se realizaron dos protocolos de inyección de BrdU in vivo (ver materiales y métodos).

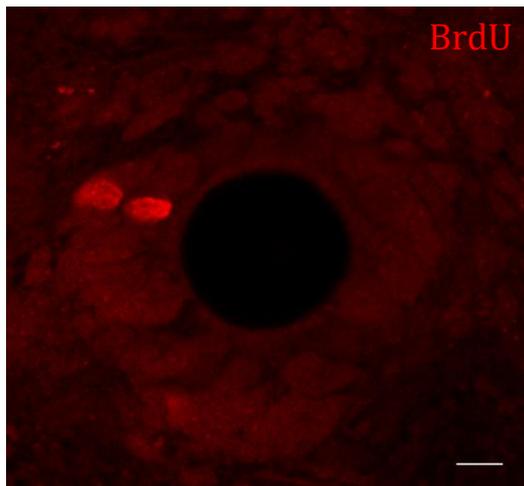


Figura 9. Inmunohistoquímica para BrdU. Se ven dos núcleos BrdU+ muy próximos entre sí, dando idea de un posible evento de división nuclear. Uno de los núcleos se encuentra en contacto con el CC. Sección del ensanchamiento lumbar de tortuga lesionada 30dpl, protocolo de inyección de BrdU segundo grupo. Escala=10 μ m.

La inmunohistoquímica reveló la presencia de células 5-HT+ y núcleos BrdU+ (Figura 10 y Figura 11), pero no se evidenció ninguna célula doble marcada (Figura 10 y Figura 11).

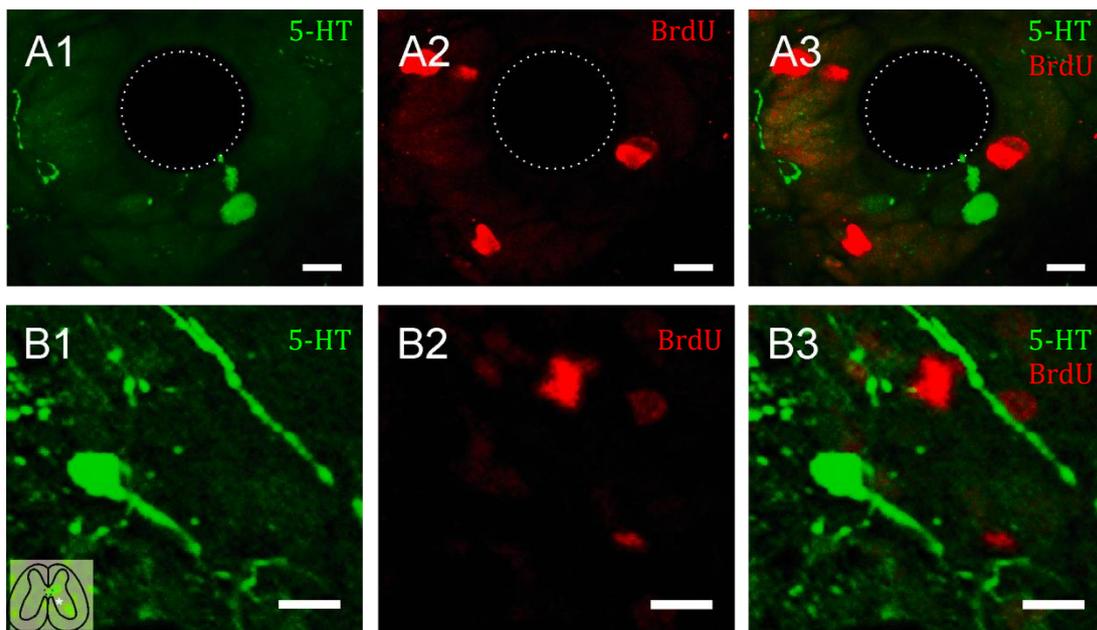


Figura 10. Inmunomarcado para BrdU y 5-HT. **A1-A3**_No se ven células doble marcadas. **B1-B3**_Se muestran núcleos BrdU+ y una célula 5-HT+, ambas señales no co-localizan. Secciones del ensanchamiento lumbar de tortugas lesionadas fijadas a los 30 días post-lesión. Escala: A1-A3 y B1-B3= 20 μ m.

Esto nos indica que las células 5-HT+ no se encontraron en fase de síntesis de ADN y por tanto no se generaron producto de la división de células progenitoras. Se pudieron evidenciar núcleos BrdU+ muy próximos entre sí, probablemente resultado de una división celular (Figura 9).

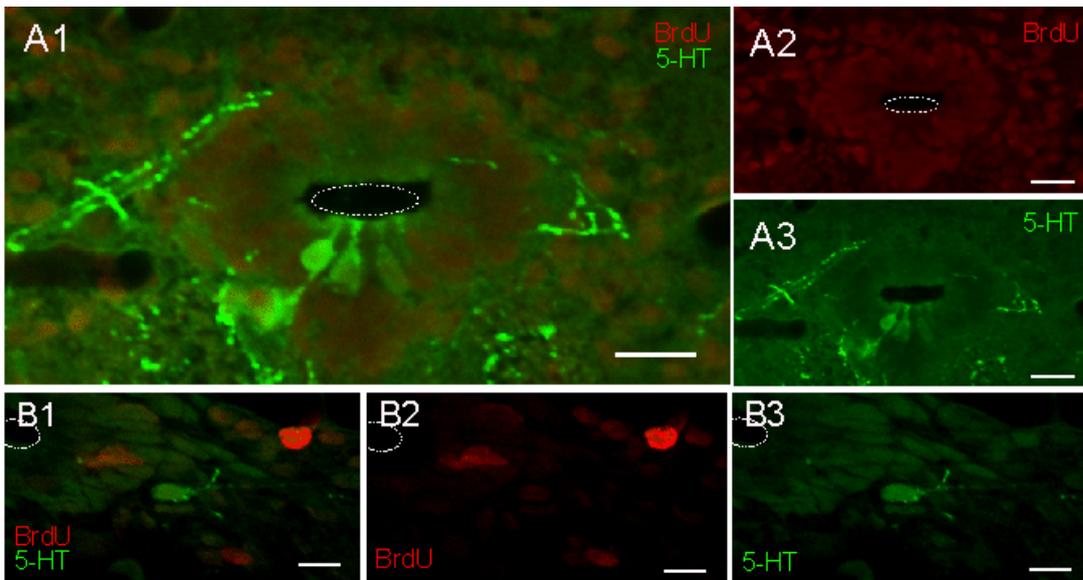


Figura 11. Inmunomarcado para BrdU y 5-HT. **A1-A3**_Región centrada en el CC. Se ven células 5-HT (A1, B1), y núcleos BrdU+ (A2, B2), pero no se ven células doble marcadas. **B1-B3**_Región fuera del CC, como se muestra en el esquema en B1. Secciones del ensanchamiento lumbar de tortugas lesionadas fijadas a los 30 días post-lesión. Escala: A1-A3 y B1-B3= 10 μ m.

Cuantificamos el número de células BrdU+ próximas al CC. En un primer momento se analizaron los datos obtenidos en tortugas lesionadas, inyectadas durante la primera semana posterior a la lesión, y perfundidas pasados 30 días de realizada dicha lesión (30dpl *1); y se compararon con los datos de tortugas LF con el mismo protocolo (LF *1). Se encontró un aumento aparente de núcleos BrdU+ en tortugas LF *1 (9 ± 3 núcleos BrdU+) respecto a tortugas 30 dpl *1 (11 ± 5 núcleos BrdU+) (Figura 12_A). Lo mismo sucedió al estudiar los datos procesados de tortugas inyectadas durante la segunda semana posterior a la lesión, y perfundidas a los 30 días de realizada la lesión (30dpl *2) (11 ± 4 núcleos BrdU+); y compararlos con los datos de tortugas LF con el mismo protocolo (LF *2) (13 ± 6 núcleos BrdU+) (Figura 12_B).

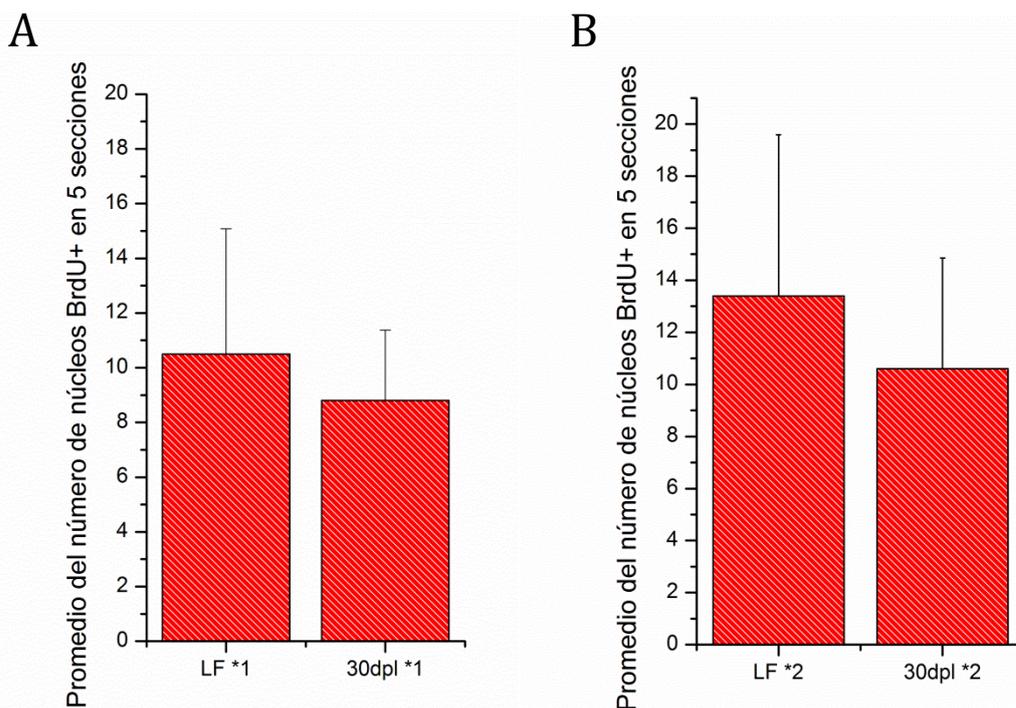


Figura12. **A_** Promedio del número total de núcleos BrdU positivos sumados en cinco secciones de 70µm, de la médula espinal de tortugas LF y L30dpl a las que se le inyectó BrdU en la primer semana (*1). **B_** Promedio del número total de núcleos BrdU+ en cinco secciones de 70µm, de la médula espinal de tortugas LF y L30dpl a las que se le aplicaron las inyecciones de BrdU en la segunda semana (*2).

La cuantificación de células BrdU+ no mostró una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de lesionadas y el grupo LF, así como tampoco entre los grupos con distinto protocolo de inyección de BrdU. Por este motivo, se resolvió trabajar con un pool de tortugas lesionadas 30dpl, sin tomar en cuenta el protocolo de BrdU utilizado; y con un pool de tortugas LF de igual manera (Tabla 1).

BrdU		
	Promedio	Desvío
LF	12	5
L30 dpl	10	4

Tabla 1. Promedio y desvío estándar del número de núcleos BrdU+ por sección, diferenciando el grupo de lesionadas L30dpl y el grupo LF, sin discriminar entre los dos protocolos de inyección de BrdU.

Co-localización de serotonina con marcadores de linaje neuronal

Mediante un nuevo experimento se buscó determinar si las nuevas células serotoninérgicas son de naturaleza glial ó neuronal. Para confirmar la naturaleza neuronal de las células serotoninérgicas de las tortugas lesionadas 30dpl realizamos el inmunomarcado con anticuerpos anti 5-HT y anti HuC/D, que es un marcador de neuronal temprano. Este marcador se expresa tempranamente en la diferenciación neuronal y luego se mantiene en toda la vida de la neurona. Encontramos que 76 de 79 células 5-HT+ son positivas para el inmunomarcado con HuC/D (figura 13).

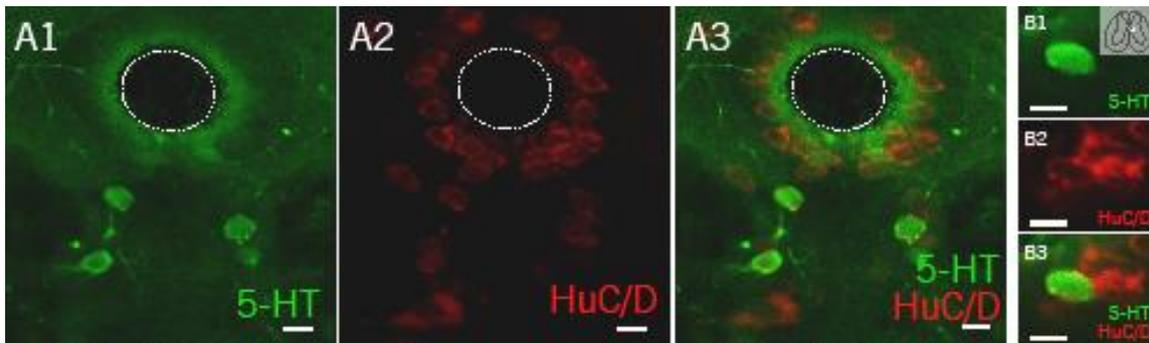


Figura 13_ Inmunomarcado para HuC/D y 5-HT, secciones del ensanchamiento lumbar de tortugas lesionadas fijadas a los 30 días post-lesión. **A1-A3_** Encontramos células 5-HT+ que no están en contacto con el CC, se ve que son positivas para el marcador neuronal HuC/D. **B1-B3_** Ampliación de célula en contacto con el CC, es una célula 5-HT+ y HuC/D+. Escala A1-A3 y B1-B3= 10μm.

Posteriormente se buscó determinar el linaje de las células serotoninérgicas encontradas, por lo que se estudió la expresión de genes pro-neurales. El factor de transcripción Nkx6.1, como vimos previamente, participa en la diferenciación de neuronas serotoninérgicas, es por esto que se estudió su expresión en la médula espinal de tortugas LF y lesionadas. Se realizó el doble inmunomarcado con anti-5-HT y anti- Nkx6.1.

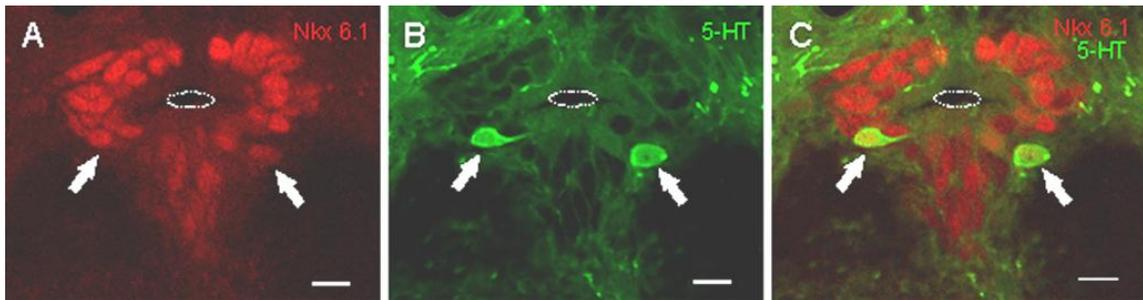


Figura 14_Inmunomarcado para Nkx6.1 y 5-HT. Las flechas indican células 5-HT+(en 13_A y C), se ve que son positivas para el marcador del factor de transcripción Nkx6.1(en 13_B y C). Secciones del ensanchamiento lumbar de tortugas lesionadas fijadas a los 30 días post-lesión. Escala= 10 μ m.

Encontramos núcleos Nkx6.1+ rodeando el canal central, en la sustancia gris ventromedial y en las astas ventrales (Figura 14). Se encontró que la gran mayoría de las células positivas para la serotonina co-localizaban el factor de transcripción Nkx6.1, tanto en el grupo LF (20 de 21 células 5-HT+), como en el grupo de lesionadas 30dpl (120 de 125 células 5-Ht+). Esto se vio tanto en tortugas LF así como en las tortugas lesionadas 30dpl.

DISCUSIÓN

Lesiones de la médula espinal: validación del protocolo experimental

La evaluación in vivo de la lesión permitió descartar del estudio a aquellos animales que no fueron lesionados completamente. A modo de prueba, se analizó la médula espinal de una tortuga que a los días de realizada la lesión de la médula espinal recuperó la movilidad de los miembro posteriores. La inmunohistoquímica para la serotonina reveló un fenotipo mixto, con fibras tipo LF pero también alto número de células 5-HT, característico de las tortugas lesionadas. Esto pone de manifiesto la necesidad de realizar las pruebas in vivo para evitar errores en los datos utilizados.

Aumento de células serotoninérgicas en tortugas lesionadas

El objetivo de este trabajo fue estudiar la inervación serotoninérgica en la médula espinal lumbar frente a una lesión a nivel torácico. Estudios realizados en embriones de rana probaron que existe una modulación de los neurotransmisores expresados que es dependiente de la actividad (Borodinsky et al. 2004). La lesión medular torácica en la tortuga provocó una disminución de las aferencias a nivel lumbar, lo que se supone una baja en la actividad de los circuitos espinales. Siendo la serotonina un neurotransmisor excitatorio, se espera que su expresión en algunos elementos del circuito se vea aumentada en forma homeostática.

En cuanto a la recuperación de la locomoción, el 20% de las tortugas utilizadas consiguieron recuperar la movilidad de al menos uno de los miembros posteriores 30 días luego de ser lesionadas. Los porcentajes de recuperación parcial obtenidos en los trabajos previos publicados por el equipo de investigación son de 45% considerando tortugas con una sobrevida de entre 2 y 3 meses (Rehermann et al. 2009). La diferencia sería consecuencia principalmente del tiempo de sobrevida de los animales. Aquellos animales que no lograron ningún tipo de recuperación funcional podría deberse a una baja en la calidad de vida debido a la lesión. Sin embargo, incluso en estos animales se da cierto grado de regeneración celular, como ser disminución del número de botones serotoninérgicos, y aumento en el número de células serotoninérgicas.

Estudios en embriones de *Xenopus* plantean que los cambios actividad-dependiente que modifican el número de neuronas serotoninérgicas conllevan a consecuencias funcionales. Estos investigadores probaron que un aumento del número de células serotoninérgicas (excitatorias) induce una disminución de la duración de los episodios de nado, sugiriendo que la plasticidad del fenotipo de un neurotransmisor tiene consecuencias funcionales a nivel comportamental (Demarque & Spitzer, 2010; Spitzer, 1012).

Tomando esto en consideración, el aumento de células serotoninérgicas a los 30 días de realizada la lesión medular en la tortuga podría estar influenciando en la actividad de la red neuronal que regula la actividad motora de los miembros posteriores. Se puede plantear como objetivo a futuro, estudiar la respuesta de las motoneuronas ubicadas en la médula espinal lumbar de la tortuga luego de la lesión.

El aumento de células 5-HT+ en los segmentos del ensanchamiento lumbar de tortugas lesionadas sería necesario para mantener el equilibrio homeostático del sistema dada la importancia del sistema serotoninérgico en la actividad locomotora. Como ya fue descrito por otros autores, la serotonina cumple un rol protagónico en la modulación de los circuitos motores (Kiehn et al. 1992; Demarque & Spitzer, 2010; Craven et al. 2004).

La diferencia no significativa en el número de células 5-HT+ entre los grupos Lesionadas 10dpl y 30dpl podría deberse a que el número de tortugas utilizado en cada grupo no es lo suficientemente grande para distinguir diferencias. Encontramos una tendencia al aumento en el número de células 5-HT+ ya a los 10 días de realizada la lesión, que es la ventana temporal más temprana analizada. Como trabajo a futuro sería interesante aumentar el número de tortugas en cada grupo, así como también introducir un grupo intermedio de 20dpl, para estudiar con mayor resolución los cambios que ocurren a lo largo de un mes luego de una lesión.

Génesis y naturaleza de las nuevas células serotoninérgicas

Al analizar tanto los grupos de Lesionadas como el LF, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el número de núcleos BrdU+ próximos al canal

central (CC) a nivel del ensanchamiento lumbar. A su vez, los distintos protocolos de inyección de BrdU no mostraron una diferencia significativa en el número de células estudiadas. Esto nos podría estar indicando que no hay un disparo en la proliferación celular a nivel lumbar, luego de la lesión de la medula espinal torácica en la ventana temporal analizada. Estos resultados están en consonancia con estudios previos que muestran que el aumento de la proliferación celular de la médula espinal está restringida al epicentro de la lesión (Rehermann et al. 2011), por lo que al estar el ensanchamiento lumbar muy alejado del sitio de injuria, no se espera un cambio en la proliferación celular con respecto a las tortugas LF.

Dado que nunca observamos co-localización entre BrdU y 5-HT, concluimos que el aumento de células serotoninérgicas en el ensanchamiento lumbar luego de la lesión medular no se debe a un mecanismo de neurogénesis.

Al rechazar nuestra hipótesis central, evaluamos la validez de nuestra hipótesis alternativa, donde las nuevas neuronas serotoninérgicas serían producto de un mecanismo de plasticidad neuronal de células pre-existentes.

Las células 5-HT+ que encontramos en el ensanchamiento lumbar son neuronas, ya que expresan HuC/D, una proteína que se expresa tempranamente durante la diferenciación neuronal. Para complementar estos datos, podríamos realizar un inmunomarcado para doblecortina (DCX), un marcador típico de neuronas inmaduras, con el fin de evaluar si el cambio fenotípico se produce en células con características de inmadurez. Experimentos no incluidos dentro de este trabajo, parecerían apoyar la idea de que las células serotoninérgicas de la medula lumbar presentan características de inmadurez.

Co-localización de serotonina con Nkx6.1

En vertebrados las primeras células serotoninérgicas se originan en el romboencéfalo, luego de las cuales se desarrollan neuronas 5-HT en regiones más caudales del sistema nervioso central que van a terminar por formar parte de la médula espinal. Se conoce que la proteína Sonic Hedgehog (Shh) regula la expresión de factores de transcripción que generan el subtipo específico de neuronas 5-HT en el romboencéfalo, pero no la inducción de las neuronas 5-HT más caudales (Craven et al. 2004). Shh estaría induciendo la expresión de factores de transcripción Gata 2 y Gata 3, necesarios para

la diferenciación de neuronas serotoninérgicas (Briscoe, 1999). Estos factores de transcripción determinan los tipos celulares en esa región mediante la activación de las proteínas NKx6.1 y Nkx2.2, que son factores de transcripción en la vía de síntesis de serotonina (Briscoe, 1999).

Respecto a la co-localización del factor de transcripción Nkx6.1 con la serotonina constatamos que se dio la expresión de ambos marcadores tanto en las tortugas lesionadas como en las LF. Esto nos indica que no es un proceso exclusivo en respuesta a un daño o lesión medular, sino que existe un pool de neuronas que expresan el factor de transcripción embrionario independiente de la actividad del sistema. Nkx6.1 podría estar implicado en la vía de señalización activada en la lesión, y que promueva la producción del neurotransmisor serotonina. Para que se dé la activación de la vía de síntesis de serotonina debe haber una señal que indique el cambio.

Frente a esto es que nos planteamos dos hipótesis posibles, por un lado, la señal podría ser iniciada por una baja en la actividad motora; otra posibilidad es que la señal sea una disminución en la expresión de receptores. Para testear la primera hipótesis podríamos elaborar un protocolo experimental donde en lugar de realizar la lesión de la médula espinal, introducimos un catéter con tetrodotoxina (TTX) resultando en la parálisis de los miembros posteriores. La toxina TTX es un veneno (procedente de cierto pez globo del Pacífico) que bloquea el canal de Na⁺ sensible al voltaje, produciendo una disminución gradual en los potenciales de acción presináptico y postsináptico (Koester & Siegelbaum, 2000). Si es verdadera nuestra primera hipótesis, esperamos obtener en los preparados histológicos innumomarcados para la serotonina, un fenotipo similar al de tortugas lesionadas.

Si deseamos testear nuestra segunda hipótesis, podríamos bloquear el receptor candidato, simulando así la lesión de la médula espinal. Posteriormente el uso de drogas que favorezcan la asociación con los receptores candidatos, que deberían ser capaces de revertir el efecto en estas tortugas lesionadas.

Nkx2.2 es un factor de transcripción que se expresa de forma transitoria en precursores de neuronas serotoninérgicas. En el romboencefalo *Xenopus* se ha descrito que los niveles del factor de transcripción Nkx2.2 no dependen de la actividad de descarga del sistema, siendo en este caso detectado de forma constante en los

preparados (Demarque & Spitzer, 2010). Estudios preliminares de nuestro laboratorio indicarían que las células serotoninérgicas no expresan este factor de transcripción. Esto podría deberse a que al ser un factor que se expresa de forma transitoria en el desarrollo, pudo haberse presentado en etapas más tempranas y no encontrarse una vez que la célula ya se diferenció. Para evaluar esta posibilidad es necesario estudiar más detalladamente la expresión de Nkx2.2 en el ensanchamiento lumbar de tortugas L30dpl, y a tiempos más cortos luego de una lesión espinal.

Marcado de células con anticuerpo anti-TPH

Por otra parte, en futuros estudios sería útil realizar un inmunomarcado de células en el ensanchamiento lumbar empleando el anticuerpo anti-TPH (tryptofan hidroxilasa) como marcador de células serotoninérgicas ya que algunos autores discuten que hay células capaces de recapturar y acumular serotonina presente en el medio, pero que no la producen. Estas células podrían estar dando resultados no válidos en nuestro trabajo, ya que si fuera así no estaríamos trabajando con células 5-HT+ “bonafide”.

Rehabilitación motora

Basándose en el modelo de control tripartito y CGP's en lesiones medulares, mencionados en la introducción de este trabajo, un grupo de investigadores estudió la neuroplasticidad endógena de la médula espinal producto de la intervención exógena por rehabilitación. Este grupo parte de la base que hay un circuito espinal intacto por debajo del sitio de la lesión que puede ser reforzado luego de la lesión para lograr que mantengan su función, favoreciendo las interacciones en la reorganización de los tractos descendentes (Rossignol et al. 2007). Mediante el entrenamiento en una cinta automática Rossignol et al. (2007) lograron una mejor recuperación de la locomoción en gatos espinalizados. Como posible experimento a futuro, podríamos probar mover los miembros posteriores de las tortugas lesionadas a modo de tratamiento de rehabilitación. Por un lado sería importante ver si efectivamente se da una reducción en el tiempo necesario para que recuperen la movilidad de miembros posteriores, y por otro lado estudiar si hay una interacción con el sistema serotoninérgico. Un posible protocolo de experimentación debería de incluir sesiones diarias donde se muevan activamente los miembros posteriores de la tortuga durante un período de 30

días, cuando se evaluaría in vivo la recuperación motora. Posteriormente se procedería a la perfusión del animal y estudio de las fibras y células serotoninérgicas mediante inmunohistoquímica.

Conclusiones finales

Los resultados del presente trabajo demuestran que hay efectivamente un aumento significativo de células serotoninérgicas en el ensanchamiento lumbar de tortugas que fueron sometidas a una lesión medular torácica. Este aumento en la cantidad de células serotoninérgicas no se debe a un mecanismo de neurogénesis, según los resultados obtenidos utilizando el marcador de proliferación celular BrdU. Es por esto que estudiamos nuestra hipótesis alternativa, la cual plantea que el aumento de células serotoninérgicas se debe a un proceso de cambio fenotípico de células que ya estaban presentes. Probamos mediante inmunohistoquímica que estas células son neuronas ya que todas ellas expresan el marcador HuC/D. A su vez, pudimos identificar al factor de transcripción Nkx6.1 como modulador de la vía serotoninérgica. La acción del Nkx6.1 estaría vinculada a la activación de la vía de síntesis de serotonina como mecanismo potencialmente compensatorio frente a la lesión de la médula espinal. A futuro podríamos realizar nuevos experimentos para continuar dilucidando los mecanismos celulares involucrados en la recuperación funcional que se da en la tortuga luego de una lesión medular.

BIBLOGRAFÍA

Antri M, Orsal D, Barthe J. Locomotor recovery in the chronic spinal rat: effects of long-term treatment with a 5-HT₂ agonist. *European Journal of Neuroscience* **16**, 467 (2002).

Antri M, Mouffle C, Orsal D, Barthe J. 5-HT_{1A} receptors are involved in short- and long-term precesses responsible for 5-HT-induced locomotor function recovery in chronic spinal rat. *European Journal of Neuroscience* **18**: 1963-1972 (2003).

Arias-Carrion, O; Drucker-Colín, R. Neurogénesis como estrategia terapéutica para regenerar el sistema nervioso central. *Revisión en Neurociencia* **45**(12): 739-745 (2007).

Arias-Carrion, O; Olivares-Bañuelos, T; Drucker-Colín, R. Neurogénesis en el cerebro adulto. *Revisión en Neurociencia* **44**(9): 541-550 (2007).

Bennett, R.A. A review of anesthesia and chemical restraint in reptiles. *J. Zoo. Wildlife Med.*; **22**(3): 282-303 (1991).

Berkowitz, Ari; Stein, Paul S.G. Descending Propriospinal Axons in the Hindlimb Enlargement of the Red-Eared Turtle: Cells of Origin and Funicular Courses. *The Journal of Comparative Neurology* **346**:321-336 (1994).

Berkowitz, Ari. Broadly Tuned Spinal Neurons for Each Form of Fictive Scratching in Spinal Turtles. *Journal of Neurophysiology* **86**:1017-1025 (2001).

Bradbury E, McMahon S. Spinal Cord repair strategies: why do they work?. *Nature Reviews, Neurociencia* **7**, 644-653 (2006).

Branchereau, Pascal; Chapron, Jacqueline; Pierre, Meyrand. Descending 5-Hydroxytryptamine Raphe Inputs Repress the Expression of Serotonergic Neurons and Slow the Maturation of Inhibitory Systems in Mouse Embryonic Spinal Cord. *The Journal of Neurosciences*, **22**(7): 2598-2606 (2002).

Bloom, Floyd E. Neurotransmisión y Sistema Nervioso Central. En: *Goodman & Gilman's: Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Undécima edición, McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C. V. (Brunton, Laurence L.; Lazo John S. Parker., Keith L., editores), pp 317-340 (2006).

Bortolato, Marco; Pivac, Nela; Seler, Dorotea Muck; Perkovic, Matea Nikolac; Pessia, Mauro; Di Giovanni, Giuseppe. The role of serotonergic system at the interface of aggression and suicide. *Neuroscience*, april 16; **236**: 160-185 (2013).

Borodinsky L, Root C, Cronin J, Sann S, Gu X, Spitzer N. Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons. *Nature*, vol 429 (2004).

Coumans, Jean V.; Tai-Sen Lin, Ted; Ning Dai, Hai; MacArthur, Linda; McAtee, Marietta; Nash, Carmen; Bergman, Barbara S. Axonal Regeneration and Functional Recovery after Complete Spinal Cord Transection in Rats by Delayed Treatment with Transplants and Neurotrophins. *The Journal of Neuroscience*, 21(23):9334–9344 (2001).

Craven, S; Lim, K; Ye, W; Douglas Engel, J; de Sauvage, F; Rosenthal, A. Gata2 specifies serotonergic neurons downstream of sonic hedgehog. *The company of Biologists*, 1165-1173 (2004).

Demarque, Michael; Spitzer, Nicholas. Activity-Dependent Expression of Lmx1b Regulates Specification of Serotonergic Neurons Modulating Swimming Behavior. *Neuron*. 29; 67(2): 321-334 (2010).

Dulcis, D; Spitzer, Nicholas. Reserve pool neuron transmitter respecification: novel neuroplasticity. *Dev Neurobiol*. 72(4): 465–474 (2012).

Fernández, A; Radmilovich, M; Trujillo-Cenóz O. Neurogenesis and gliogenesis in the spinal cord of turtles. *J Comp Neurol* 453:131–144. (2002).

Frazer, Alan & Hensler, Julie. Serotonin. En: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects, 6th edition. Editores: George J Siegel, MD, Editor-in-Chief, Bernard W Agranoff, MD, R Wayne Albers, PhD, Stephen K Fisher, PhD, and Michael D Uhler, PhD. *capitulo 13* (1999).

Ghosh, Mousumi & Pearse, Damien. The role of serotonergic system in locomotor recovery after spinal cord injury. *Frontiers in neural circuits*, volume 8, article 151 (2015).

Harris-Warrick, Ronald M. & Cohen, Avis H. Serotonin modulates the Central Pattern Generator for locomotion in the isolated lamprey spinal cord. *J. exp. Biol.* 116, 27-46 (1985).

Koester, John & Siegelbaum, Steven. Propagación de las señales: el potencial de acción. En: *Principios de neurociencia*, Cuarta edición, McGraw-Hill Interamericana, Editores Kandel, Eric; Schwartz, James; Jessell, Thomas. pp 150-170 (2000).

Lledo, Pierre-Marie; Alonso, Mariana; Grubb, Matthew S. Adult Neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews: Neuroscience*, volume 7: 179-193(2006).

Marder, Eve. Neuromodulation of Neuronal Circuits: Back to the Future. *Neuron* 76, Elsevier Inc.(2012).

Marichal N, García G, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz Omar, Russo R. Enigmatic Central Canal Contacting Cells: Immature Neurons in “Standby Mode”? *The Journal of Neuroscience*, 29(32):10010 –10024 (2009).

MacKay-Lyons, Marilyn. Central Pattern Generation of Locomotion: A Review of the Evidence. *Phys Ther.* 82:69-83 (2002).

Mortin, Lawrence I. & Stein, Paul S. G. Spinal Cord Segments Containing Key Elements of the Central Pattern Generators for Three Forms of Scratch Reflex in the Turtle. *The Journal of Neuroscience* 9(7): 2285-2296 (1989).

Nowakowski, R. S.; Lewin, S. B.; Miller, M. W. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *Journal of Neurocytology* 18, 311-318 (1989)

Pearson, Keir & Gordon, James. Reflejos medulares. En: *Principios de neurociencia*, Cuarta edición, McGraw-Hill Interamericana, Editores Kandel, Eric; Schwartz, James; Jessell, Thomas. pp713-736 (2000).

Perrier, Jean-Francois. Modulation of motoneuron activity by serotonin. *Danish medical Journal* 63(2); B5204, pp1-12 (2015)

Perrier, Jean-Francois & Cotel, Florence. Serotonin differentially modulates the intrinsic properties of spinal motoneurons from the adult turtle. *Journal of Physiology* pp1233-1238 (2008).

Rehermann M, Marichal N, Russo R, Trujillo-Cenóz O. Neural Reconnection in the Transected Spinal Cord of the Freshwater Turtle *Trachemys dorbignyi*. *The Journal of Comparative Neurology* 515:197–214 (2009).

Rehermann M, Pérez L, Trujillo O, Russo RE. Serotonergic neurons plasticity during spinal cord regeneration. *VI International meeting of the Latin American Society for de Developmental Biology*. Montevideo. Program and proceedings: 56 (Resumen) (2012).

Rehermann M, Santiñaque F, López-Carro B, Russo R, Trujillo-Cenóz O. Cell proliferation and cytoarchitectural remodeling during spinal cord reconnection in the fresh-water turtle *Trachemys dorbignyi*. *Cell Tissue Res*. 344(3): 415–433 (2011).

Rossignol S, Schwab M, Schwartz M, Fehlings M. Symposium Spinal Cord Injury: Time to Move?. *The Journal of Neuroscience* 27 (44):11782–11792 (2007).

Russo, RE; Fernández, A; Reali, C; Radmilovich, M; Trujillo-Cenóz, O. Functional and molecular clues reveal precursor-like cells and immature neurons in the turtle spinal cord. *J Physiol* 560:831–838 (2004).

Russo, RE; Reali, C; Radmilovich, M; Fernández, A; Trujillo-Cenóz, O. Connexin 43 delimits functional domains of neurogenic precursors in the spinal cord. *J Neurosci* 28:3298 – 3309 (2008).

Spitzer, Nicholas C. Activity-dependent neurotransmitter respecification. *Nature reviews Neuroscience* 13:94-106 (2012).

Westfall, Thomas C & Westfall, David P. Agonistas Y Antagonistas Adrenérgicos. En: *Goodman & Gilman's_ Las bases farmacológicas de la terapéutica, Undécima edición*, McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C. V. Brunton, Laurence L.; Lazo John S. Parker., Keith L., pp 237-295 (2006).