



Tesis de Maestría, PEDECIBA Biología, Subárea Neurociencias,  
Facultad de Ciencias, Universidad de la República

**“Cambios fenotípicos en células de la Gelatinosa Central  
de médula espinal de ratas neonatales frente a la  
injuria”**

**Lic. Gabriela García Tejedor**

**Neurofisiología Celular y Molecular**

**Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable**

**Montevideo, Uruguay**

**6 de Febrero de 2012**

**Orientador: Dr.Omar Trujillo Cenóz**

**Co-Orientador: Dr.Raúl Russo**

**Tribunal: Dra. Patricia Cassina**

**Dr. Francesco Rossi**

**Dr. Flavio Zolessi**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	Pág.1
1.1 El daño del Sistema Nervioso Central adulto es prácticamente irreparable.....	Pág.3
1.2 Epidemiología y características de las lesiones espinales.....	Pág.4
1.3 En la médula espinal existen <i>stem cell</i> neurales.....	Pág.5
1.4 Las células endimarias también reaccionan frente a la lesión medular.....	Pág.6
1.5 OBJETIVOS GENERALES.....	Pág.8
1.6 Objetivos Específicos.....	Pág.8
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	Pág.9
2.1 Modelo experimental.....	Pág.9
2.2 Procedimiento quirúrgico y cuidados postoperatorios.....	Pág.9
2.3 Técnicas inmunocitoquímicas.....	Pág.9
2.4 Análisis de la generación de nuevas células.....	Pág.12
2.5 Marcado con sustancias fluorescentes y transfección de células con lentivirus.....	Pág.13
2.6 Registros electrofisiológicos.....	Pág.14
<b>3. CAPÍTULO I Características morfológicas y moleculares de las células que conforman la Gelatinosa Central</b>	
3.1 En la GC coexisten varios tipos celulares.....	Pág.15
3.2 Algunas células conectadas al CC poseen proteínas vinculadas a la migración.....	Pág.19
3.3 Diversos fenotipos electrofisiológicos en las células conectadas al CC.....	Pág.21
3.4 Las neuronas inmaduras que contactan al CC se originan durante el período embrionario.....	Pág.24
3.5 La GC mantiene la expresión de factores de transcripción embrionarios y uno de célula madre neural.....	Pág.26
3.6 En la GC persisten células progenitoras con capacidad para proliferar durante la vida post-natal.....	Pág.27
<b>4. CAPÍTULO II Cambios frente a una lesión por compresión</b>	
4.1 Descripción y caracterización de la lesión.....	Pág.29
4.2 Identificación de las células proliferantes luego de la lesión.....	Pág.32
4.2.1 La lesión modifica las proporciones de las distintas estirpes de células	

ciclantes.....	Pág.32
4.2.2 Algunas pocas células DCX+ incorporaron BrdU luego de la lesión.....	Pág.34
4.3 Marcado de las células que rodean el CC y su posible movilización post lesión.....	Pág.35
4.3.1 Intentos de utilización de un lentivector para el marcado selectivo de las células que contactan el CC.....	Pág.35
4.3.2 Estudios con <i>Cell Tracker Green</i> sugieren que la lesión induce la migración celular a partir de la región ependimaria.....	Pág.36
4.3.3 Los fenotipos de las células potencialmente migrantes: todavía una incógnita.....	Pág.38

## 5. DISCUSIÓN

5.1 La GC de la rata neonatal es un nicho celular con propiedades plásticas.....	Pág.41
5.2 Cambios fenotípicos inducidos por la compresión.....	Pág.42
5.3 ¿Induce el daño espinal la migración de las células ependimarias?.....	Pág.44

## 6. PERSPECTIVAS.....Pág.46

## 7. ANEXO

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## RESUMEN

La región que rodea al canal central denominada Gelatinosa Central (GC) (Lenhossék, 1895) es una zona dinámica con un alto grado de plasticidad que conserva rasgos embrionarios, expresando luego del nacimiento, factores de transcripción hallados en el tubo neural (Fu *et al.*, 2003). Dadas esas particularidades, en esta tesis se caracterizó dicha región desde el punto de vista celular y molecular, explorando sus propiedades plásticas y estudiando los cambios fenotípicos resultantes de una lesión medular compresiva en ratas neonatales (P0-P5).

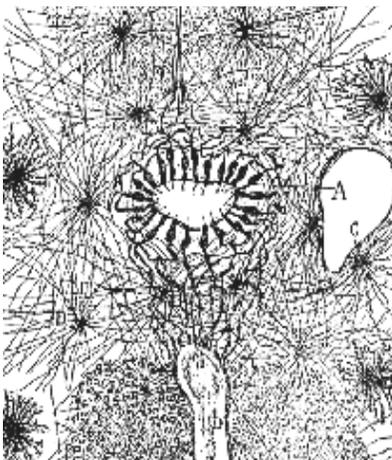
Si bien son muy numerosas las investigaciones que han utilizado ratas adultas como modelos para explorar la injuria espinal y su potencial recuperación, son escasos los estudios que se han centrado en animales recién nacidos con una potencial plasticidad morfo-funcional.

La GC presentó una gran heterogeneidad celular, destacándose la presencia de neuronas inmaduras en contacto con el líquido cefalorraquídeo. Estas células nerviosas expresaron proteínas propias de células migrantes (PSA-NCAM y DCX). Estudios realizados con BrdU demostraron que tales células fueron generadas durante la vida embrionaria. En la zona de la línea media, se observaron además células proliferantes que expresaron marcadores de células madre neurales. En respuesta a la compresión medular, se observó un aumento de proliferación celular y un sesgo en las proporciones fenotípicas de las células proliferantes. Sumado a esto, desde el punto de vista cualitativo se hallaron células DCX<sup>+</sup>, estas sí, generadas luego de la compresión. Por último, los ensayos con una molécula fluorescente que permanece incorporada al citoplasma celular (Cell Tracker Green) evidenciaron la posible migración de células en contacto con la luz del canal central como respuesta a la lesión.

## 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los tópicos incluidos en este trabajo de Maestría es el análisis celular, molecular y funcional de la zona denominada, por los autores clásicos, Gelatinosa Central (GC) (Stilling y Wallach, 1842; citado por Lenhossék, 1895), en la médula espinal de ratas neonatales. Según estos autores la GC comprende al Canal Central (CC) y a la sustancia gris que lo rodea y está limitada dorsal y ventralmente por los cordones posteriores y anteriores respectivamente (Fig. 1). El término “gelatinosa” refleja su aspecto traslúcido, similar a la Sustancia Gelatinosa de Rolando del cuerno dorsal. Esto se debe a que ambas zonas están prácticamente desprovistas de mielina. En la actualidad esta denominación no es común en la literatura, pero creemos que mantiene utilidad semántica, ya que incluye términos generalmente indefinidos tales como región pericanal, zona periependimaria, endependimaria y subependimaria y que son habituales en los trabajos recientes.

La GC es una zona dinámica, con un alto grado de plasticidad que conserva rasgos embrionarios, expresando luego del nacimiento, factores de transcripción hallados en el tubo neural (Fu *et al.*, 2003). Dadas esas particularidades decidimos explorar como uno de los puntos de esta tesis, sus propiedades plásticas estudiando los cambios fenotípicos resultantes de una lesión medular compresiva en ratas neonatales (P0-P5). Con este fin se utilizó un enfoque multitécnico que involucró abordajes inmunocitoquímicos y electrofisiológicos.



**Figura 1.** Gelatinosa Central humana. Método de Golgi, Ramón y Cajal 1909.

Si bien son muy numerosas las investigaciones que han utilizado ratas adultas como modelos para explorar la injuria espinal y su potencial recuperación, son escasos los estudios que se han centrado en animales recién nacidos con una mayor plasticidad morfo-funcional. Dado que los daños espinales producidos durante el período neonatal impactan en la morbilidad neurológica posterior, es esencial conocer en profundidad la estructura celular y molecular de la GC frente a la agresión traumática. El tema de este trabajo de Maestría forma parte de las líneas

principales de investigación que se desarrollan en el laboratorio que brinda soporte a mis actividades.

## **1.1 El daño del Sistema Nervioso Central adulto es prácticamente irreparable**

A diferencia de la mayoría de los tejidos del organismo, las lesiones del Sistema Nervioso Central (SNC) generan deficiencias anatómicas y funcionales difícilmente reparables. A partir de los trabajos de Santiago Ramón y Cajal se conoce que el daño producido por una agresión al tejido nervioso activa un conjunto de mecanismos celulares que dificultan y reducen la remodelación anatómica y el reintegro de las funciones perdidas (Ramón y Cajal 1913-1914).

Las causas que limitan la recuperación son varias y complejas. En primer lugar, las neuronas que mueren son difícilmente reemplazadas por otras, de modo que al reducirse el número de células nerviosas, se genera una pérdida crónica de las funciones que éstas desempeñaban. Aunque hoy es conocido que existe una generación continua de neuronas en algunas regiones del SNC de los mamíferos adultos, incluyendo el hombre (Lois y Álvarez Buylla, 1993; Eriksson, 1998), las zonas que presentan nichos neuronales regenerativos son escasas.

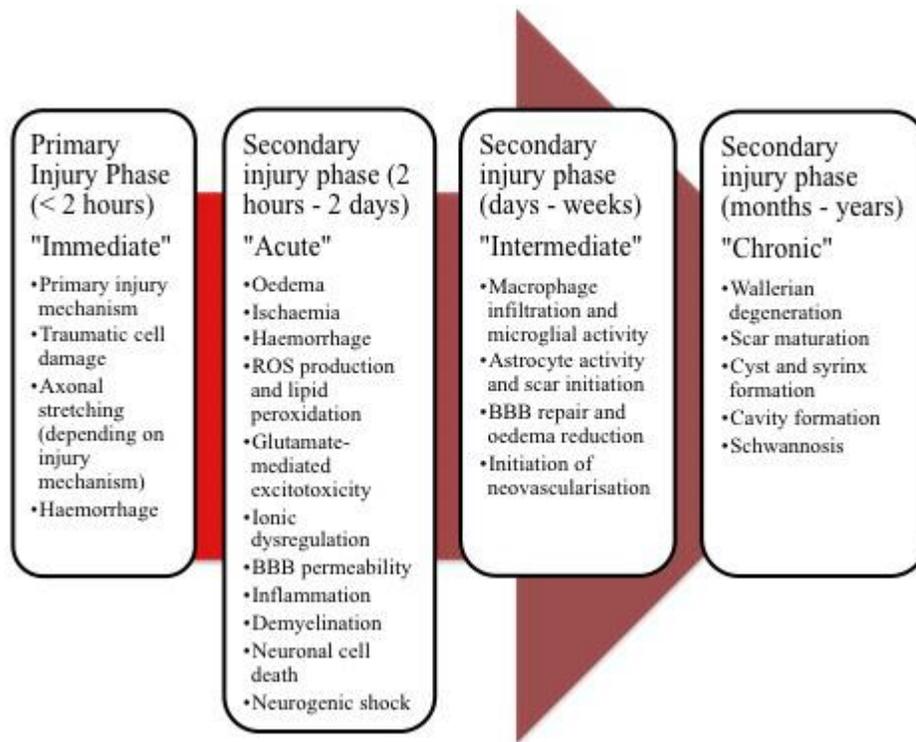
En segundo lugar, las células gliales reaccionan frente a la injuria, participando en la formación de una cicatriz glial, que limita el cruce de los axones regenerantes (Ramón y Cajal 1913-1914). Se debe destacar que esta respuesta reactiva no se considera actualmente como esencialmente negativa, sino que las células gliales se acumulan y rodean los sitios dañados para aislarlos del parénquima sano (Fawcett & Asher, 1999, Silver & Miller, 2004). Además, la cicatriz glial juega un rol importante en la estabilización post-traumática del tejido nervioso, restableciendo la continuidad física tisular y la barrera hemato-encefálica. Se ha propuesto que este mecanismo de reparación minimiza las infecciones e impide que se expanda el daño celular secundario (Sofroniew, 2009; Faulkner et al., 2004). De todos modos, la cicatriz crea una barrera física y molecular (generada por moléculas tales como Nogo, MAG, OMgp, Proteoglicanos de condroitín sulfato, etc.) que actuando en conjunto, dificultan la regeneración axónica y el tránsito de las fibras nerviosas a través de la lesión (Stichel & Muller, 1998; Busch & Silver, 2007). Sumado a esto, cabe mencionar que el SNC lesionado es pobre en factores de crecimiento (Schwab y Thoenen, 1985).

En resumen, el SNC de los mamíferos adultos es un ambiente poco propicio para el potencial crecimiento y reconexión de los axones dañados y esto impide la recuperación funcional *ad integrum*.

## **1.2 Epidemiología y características de las lesiones espinales**

Las lesiones traumáticas de la médula espinal afectan alrededor de 2.5 millones de personas en todo el mundo (Rossignol *et al.*, 2007). Las lesiones espinales son causadas mayoritariamente por accidentes, en los cuales los protagonistas principales son personas jóvenes con un promedio de edad de 33 años (Sekhon and Fehlings, 2001). Los accidentados quedan frecuentemente con secuelas severas que disminuyen sus funciones motoras, sensoriales, vegetativas y síquicas. La mayoría de las lesiones son debidas aldaño mecánico, usualmente provocado por fracturas y desplazamientos a nivel de la columna vertebral o a contusiones medulares severas unidas a estenosis del canal espinal (Sekhon and Fehlings, 2001).

La fisiopatología de la lesión de médula espinal es esencialmente bifásica, incluyendo una fase primaria y otra secundaria (Tator, 1995). La fase primaria consiste en el daño mecánico del tejido con la concomitante destrucción de neuronas, vainas gliales y axones. En la segunda fase se suman otros fenómenos acompasados con el tiempo transcurrido luego de la lesión. Estos efectos secundarios, resultan de la acción de moléculas neurotóxicas liberadas por el tejido dañado, afectan a las células sobrevivientes a la injuria primaria y generan a su vez, apoptosis y necrosis masiva de neuronas y oligodendrocitos (Norenberg *et al.*, 2004; Beattie *et al.*, 2000). Las fases intermedia y crónica se caracterizan por una degeneración progresiva, acompañada por intentos endógenos de reparación y por alteraciones morfológicas mayores (formación de cavidades quísticas, atrofiás del parénquima consecuentes a la degeneración Walleriana y retracciones debidas a la “maduración de la cicatriz”). Watson y Yeung (2011), han resumido en la figura adjunta, el conjunto de fenómenos que ocurren a lo largo del tiempo, luego de una lesión espinal severa.



**Figura 2.** Eventos que ocurren luego de la lesión medular (Tomado de Watson & Yeung, 2011)

### 1.3 En la médula espinal existen células madre neurales

El descubrimiento de células madre neurales en el cerebro adulto llevó a la reevaluación del dogma que sostenía que el SNC es irreparable (Reynolds and Weiss 1992). En la médula espinal adulta se cree que existen células madre neurales quiescentes, alojadas en las zonas "ependimaria y sub-ependimaria" (Weiss et al. 1996; Johansson et al. 1999; Shihabuddin 2008). Estas células, luego de ser reproducidas *in vitro*, forman neuroesferas y pueden transplantarse a la médula espinal adulta lesionada, promoviendo la recuperación funcional (Parr et al. 2007).

Se ha demostrado que luego de una lesión de la médula espinal, las células madre endógenas proliferan *in situ* y migran al lugar de la lesión donde se diferencian hacia la línea astrocitaria, contribuyendo a la formación de la cicatriz glial (Johansson et al. 1999). Recientemente se ha observado oligodendrogénesis y neurogénesis luego de una lesión espinal cuando se administran los factores de

crecimiento fibroblástico (FGF) y de crecimiento epidérmico (EGF), directamente en el tejido dañado (Ohori et al. 2006)

Además de su potencial aplicación en terapias de reemplazo celular, estas células progenitoras son capaces de expresar factores de crecimiento tales como el derivado del cerebro (BDNF) y el de crecimiento nervioso (NGF). Esto genera un microambiente beneficioso para el crecimiento axonal y la supervivencia celular (Blesch et al. 2002).

#### **1.4 Las células endimarias también reaccionan frente a la lesión medular**

En tortugas juveniles la GC contiene células con propiedades funcionales y moleculares de precursores neurogénicos. Ellas coexisten con otras que expresan marcadores neuronales tempranos y generan potenciales de acción, lo que indica que se trataría de neuronas inmaduras en distintos grados de diferenciación, inmersas en un nicho neurogénico (Fernández *et al.*, 2002; Russo *et al.*, 2004, 2008). Algunos estudios sugieren que en el epéndimo de los mamíferos podrían mantenerse propiedades similares capaces de sustentar mecanismos de reparación endógenos (Danilov *et al.*, 2006; Shechter *et al.*, 2007).

Las células endimarias de ratas y ratones reaccionan frente a la injuria migrando hacia el epicentro de la lesión y luego diferenciándose en distintos tipos celulares (Beattie *et al.*, 1997; Mothe and Tator, 2005; Meletis *et al.*, 2008). Este tipo de plasticidad es sobresaliente en vertebrados inferiores, en los que la región del CC organiza la reconexión de la médula espinal luego de una sección completa de la misma (Dervan y Roberts, 2003).

Algunas células endimarias en la médula espinal adulta de mamíferos proliferan (Johansson *et al.*, 1999; Meletis *et al.*, 2008), pero su diferenciación hacia el linaje neuronal parece estar inhibida (Horner *et al.*, 2000). Sin embargo, estudios inmunocitoquímicos han demostrado la presencia en el epéndimo (Alonso, 1999; Shechter *et al.*, 2007; Stoeckel *et al.*, 2003), de células de tipo neuronal que expresan proteínas propias de los neuroblastos presentes en nichos neurogénicos típicos como la zona subventricular (Lim *et al.*, 2008) y el hipocampo (Van Praag *et al.*, 2002).

Considerando las características de la GC, mi atención se centrará en ella, intentando en primera instancia, su caracterización en condiciones normales y analizando posteriormente las modificaciones que experimenta luego de una lesión.

***Teniendo en cuenta la suma de la información actualizada, y los datos e ideas generados en el seno de nuestro equipo de investigación, esta tesis concibe, como hipótesis de trabajo, la idea que la GC de la rata neonatal es un nicho celular con propiedades proliferantes y neurogénicas. También incluye como consecuencia lógica, la hipótesis de que dicha región posee capacidad plástica que se pone en evidencia como respuesta a la injuria mecánica.***

## 1.5 OBJETIVOS GENERALES

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, esta tesis tiene dos objetivos principales: a) identificar los fenotipos morfológicos, moleculares y funcionales de algunas de las poblaciones celulares que integran la GC y b) explorar los cambios plásticos generados en ella, por lesiones compresivas a nivel lumbar. Para ello se utilizó un enfoque multitécnico que facilitó, aunando información derivada de esos dos objetivos, una mejor comprensión de los complejos fenómenos desencadenados por la injuria espinal traumática en ratas neonatas.

## 1.6 Objetivos Específicos

- 1- Caracterización inmunocitoquímica y electrofisiológica de las células de la GC en condiciones normales.
- 2- Análisis de los cambios en la proliferación celular luego de una lesión por compresión.
- 3- Determinación del fenotipo molecular de las células proliferantes.
- 4- Rastreo y análisis fenotípico de las posibles células migrantes mediante la incorporación "*in vivo*" de moléculas fluorescentes exógenas (*Cell Tracker Green* (CTG)). También se ensayó el empleo de vectores lentivirales que contenían la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente (GFP).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Modelo experimental**

Se utilizaron ratas neonatales (P0-P8) de la cepa *Sprague Dawley* provenientes del bioterio del IIBCE, mantenidas de acuerdo con los estándares aceptados internacionalmente. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de bioética del IIBCE.

### **2.2 Procedimiento quirúrgico y cuidados postoperatorios**

Previo a la lesión, los animales fueron anestesiados con Ketamina-Xilacina (i/p, 90 y 10 mg/kg respectivamente) con un soporte adicional de Isoflurano por inhalación. La lesión mecánica, fue realizada mediante la compresión de la columna vertebral expuesta quirúrgicamente a nivel lumbar, aplicando una presión moderada con una pinza fina (Dumont N°5) durante 30 segundos. Luego se suturó la herida con un hilo de seda (DS 19) procurando, en todas las etapas, trabajar en condiciones asépticas. Luego de la recuperación del efecto de la anestesia, las ratas se mantuvieron en un ambiente seco a 27°C y fueron alimentados cada 2-3 horas con leche bovina descremada y tibia, diluida con agua (al comienzo, 1/4). Los animales no fueron devueltos a la madre porque usualmente las ratas recurren al canibalismo para eliminar las crías lesionadas.

### **2.3 Técnicas inmunocitoquímicas**

Los tejidos se fijaron por perfusión intracardíaca con paraformaldehído disuelto en "buffer" fosfato (BF) pH 7,4 (al 4 o al 10% según el anticuerpo que se fuera a utilizar). Los procedimientos quirúrgicos para exponer el corazón y grandes vasos se llevaron a cabo en animales anestesiados con dosis letales de pentobarbital (100 mg/kg, i.p.).

Las médulas fueron disecadas y divididas en tres partes correspondientes a los segmentos cervicales, torácicos y lumbares, y posteriormente encastrados en

bloques de gelatina-albúmina. Cuando se trabajó con animales lesionados siempre se incluyó en el encastre un segmento homólogo proveniente de un animal normal. Esto nos permitió comparar las estructuras alteradas con sus referentes normales, procesados en condiciones iguales (aspecto relevante al trabajar con técnicas inmunohistoquímicas, extremadamente sensibles a variaciones poco perceptibles durante el procesamiento de las muestras).

Se efectuaron cortes de 60  $\mu\text{m}$  de espesor, con un micrótomo de cuchilla vibratoria; los mismos fueron lavados abundantemente en buffer fosfato e incubados con los diferentes anticuerpos primarios disueltos en BF-Tritón X-100 (0.3%) (pH 7,4) a concentraciones óptimas determinadas empíricamente. Los tiempos de incubación variaron entre 24 y 72 horas, dependiendo del anticuerpo utilizado. La nómina de los anticuerpos primarios al igual que sus características, orígenes y diluciones más adecuadas se detallan en la tabla 1. Los anticuerpos secundarios, conjugados con un fluoróforo o una enzima cromogénica, fueron incubados en condiciones similares pero sólo durante una hora a temperatura ambiente. En el caso de determinar la existencia de proteínas co-localizadas en una misma célula o estructura, se procuró disminuir el nivel de incertidumbre utilizando dos anticuerpos secundarios cuyos fluoróforos emitieran en longitudes de onda con mínima superposición en el espectro. En todos los casos se realizaron experimentos control: a) incubando los tejidos sin el anticuerpo primario y poniéndolos luego en contacto con el secundario, b) haciendo actuar únicamente el anticuerpo primario sin revelado posterior con el secundario y c) omitiendo ambos anticuerpos (detectando sólo autofluorescencias).

Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal *Olympus* (VF300) de tres láseres (488, 543 y 633 nm), mediante el programa *Fluoview 5*. Cuando se consideró pertinente se analizaron los planos ortogonales de secciones ópticas superpuestas a lo largo del eje Z.

Antígeno	Inmunógeno	Anticuerpo	Dilución
<b>3CB2</b>	Mezcla proteica de proteínas solubilizadas del tectum óptico de embrión de pollo en estadio 34 H&H	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) University of Iowa, ratón monoclonal, cat.no. 3CB2	1:10
<b>Brain lipid-binding protein (BLBP)</b>	Proteína BLBP Recombinante total	Chemicon, conejo policlonal cat. no.AB 9558, lot no. 6080037568	1: 300
<b>Bromodeoxiuridina (BrdU)</b>	BrdU conjugado a seroalbúmina bovina (BSA)	Dako Cytomation, ratón monoclonal, cat. no. M0744, lot. no. 00004862	1:500
<b>Doublecortin (DCX)</b>	Péptido de la región C-terminal de DCX de humano	Santa Cruz Biotechnology, cabra policlonal, cat. no.sc-8066	1:100
<b>Glial fibrillar acidic protein (GFAP)</b>	Proteína GFAP purificada de médula espinal de cerdo	Sigma-Aldrich, ratón monoclonal, product no. G3893, lot no. 037K4759	1:500
<b>Human neuronal protein (HuC/D)</b>	Proteína de unión al ARN de la familia Elav (embryonic lethal abnormal visual) de ratón	Molecular Probes, ratón monoclonal, cat. no. 21275, lot no. A21275	1:100
<b>NCAM polysiliated (PSANCAM)</b>	Membranas de médula espinal de embrión de rata (E15-E18)	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) University of Iowa, ratón monoclonal, cat.no. 5A5	1:10
<b>Nestina</b>	Proteína recombinante de 150 aminoácidos de humano unida a GST	Abcam, ratón monoclonal, cat no.ab22035	1:1000
<b>Neurofilament M (NF-M)</b>	Proteína de fusión recombinante conteniendo el extremo C-terminal (168 aminoácidos) de neurofilamento de rata	Chemicon, conejo policlonal, cat. no. AB1987, lot no. 18030413	1:500
<b>Neuronal Nuclei (NeuN)</b>	Núcleos purificados de células de cerebro de ratón	Chemicon, ratón monoclonal cat. no.MAB377, lot no. 23040880	1:100
<b>NG2</b>	Dominio extracelular de NG2 de rata	Donación del Dr. Bill Stallcup, conejo policlonal	1:500
<b>PAX 6</b>	Proteína recombinante conteniendo la secuencia aminoacídica (1-223) de PAX6 de pollo.	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) University of Iowa, ratón monoclonal, cat.no. PAX6	1:10
<b>PAX 7</b>	Proteína recombinante conteniendo la secuencia aminoacídica (352-523) de PAX7 de pollo.	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) University of Iowa, ratón monoclonal, cat.no. PAX7	1:10
<b>Platelet derived Growth Factor receptor (PDGFR-<math>\alpha</math>)</b>	PDGFR- $\alpha$ de rata	Donación del Dr. Bill Stallcup, conejo policlonal	1:500
<b>p-Histone H3 (pH3)</b>	Corta secuencia aminoacídica de la Histona H3 de humano conteniendo la Ser 10 fosforilada	Santa Cruz Biotechnology, conejo policlonal, cat. no.sc-8656-R	1:100
<b>Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)</b>	Aminoácidos (1-261) de la proteína PCNA de Humano	Santa Cruz Biotechnology, conejo policlonal, cat. no.sc-7907	1:100
<b>Proteína de homeodominio NK (Nkx 2.2)</b>	Proteína de fusión GST unida a Nkx2.2 de pollo	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) University of Iowa, ratón monoclonal, cat.no. 74.5A5	1:10
<b>Proteína de homeodominio NK (Nkx 6.1)</b>	Proteína de fusión GST unida a secuencia aminoacídica (299-365) Nkx6.1 de rata E9	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) University of Iowa, ratón monoclonal, cat.no. F55A10	1:10
<b>RIP</b>	Homogenizado de bulbo olfatorio de rata	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) University of Iowa, ratón monoclonal, cat.no. RIP	1:10
<b>S100<math>\beta</math></b>	S100 $\beta$ de cerebro bovino	Sigma-Aldrich, ratón monoclonal, producto no.S2532	1:500
<b>Sox 2</b>	Corta secuencia aminoacídica (131-195) de Sox-2 Humano	Santa Cruz Biotechnology, conejo policlonal, cat. no.sc-20088	1:500
<b>Vimentina</b>	Homogenizado de cerebro de canario	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) University of Iowa, ratón monoclonal, cat.no. 40E-C	1:10

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados

## 2.4 Análisis de la generación de nuevas células

Para la determinación del momento de nacimiento de las distintas células, se utilizó el marcado nuclear BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina, SIGMA), análogo estructural de la timidina, que sustituye el empleo de su forma tritiada, lo que evita el trabajo con elementos radioactivos. Esta molécula es incorporada en la fase S del ciclo celular, y su presencia puede ser revelada mediante la utilización de anticuerpos específicos. Esto permite identificar a las células proliferantes y a parte de su descendencia (el marcado se va diluyendo al cabo de cada división, hasta no ser detectable). En el caso particular de las células nerviosas que tapizan el CC, se trató de determinar si nacían durante los primeros días de vida postnatal o si por el contrario, su existencia databa del período de vida intrauterina. Para ello se realizaron inyecciones i.p. diarias de 100 mg/kg desde P0 a P5, sacrificándose los animales en distintos momentos luego del nacimiento (P6, P15 y P21) (n=3, para cada tiempo). En otros experimentos se efectuaron inyecciones i.p. diarias de BrdU a ratas preñadas (100 mg/kg, i.p.) a partir del día séptimo hasta el decimoséptimo del período gestacional (n=3). Los animales neonatales fueron sacrificados en dos momentos: inmediatamente luego del nacimiento (P0) (n=3) y cinco días después (P5) (n=3). En cuanto a la fijación, encastre y obtención de los cortes, se procedió de la manera descrita en la sección anterior. Para la detección de las células que incorporaron BrdU se siguió el procedimiento estándar; los cortes fueron lavados e incubados en HCl 1N durante 20 minutos, posteriormente se los lavó nuevamente y se procedió al bloqueo con BSA (Seroalbúmina bovina). Luego se incubaron de un modo secuencial en el anticuerpo primario anti-BrdU y anti- HuC/D (ver tabla 1) durante toda la noche para su posterior revelado con dos anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos que emiten en longitudes de onda diferentes (Alexa 488 y 633).

Cuando se estudió la proliferación celular producto de una lesión compresiva, se inyectó BrdU (100 mg/kg) i.p. una hora antes de la lesión con el fin de detectar células en fase S coincidentes con el momento de la injuria. Los animales fueron sacrificados en diferentes momentos posteriores a la lesión a fin de monitorear la reacción de las células de la GC al cabo de tres días. Como control se utilizaron

ratas de la misma camada que las lesionadas y a las que se les inyectó la misma dosis de BrdU, al mismo tiempo, y proveniente de la misma solución madre. El procedimiento para detectar las células que incorporaron BrdU ha sido descrito en los párrafos precedentes. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el programa *ImageJ* utilizando el “*plugin*” de conteo de núcleos. A fin de determinar el umbral máximo y mínimo del tamaño de los elementos que debería detectar el programa, se contaron manualmente los núcleos marcados en varios cortes y se ajustaron los parámetros para alcanzar la coincidencia entre el conteo manual y el automático. De allí en más los conteos fueron siempre realizados por el programa. Posteriormente, los cortes se incubaron en un segundo anticuerpo primario (anti-BLBP, anti-NG2, anti-PDGFR $\alpha$ , anti-GFAP y anti-DCX; por otros detalles ver tabla 1). Posteriormente se reveló con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a Alexa 488 o 633. Por último se procedió a la cuantificación de las que hubiesen incorporado BrdU tanto en condiciones de lesión como control, En todos los casos los datos fueron analizados con el estadístico apropiado (t-test no pareado).

## **2.5 Marcado con sustancias fluorescentes y transfección de células con lentivirus**

En este caso los animales se anestesiaron con un anestésico volátil (isoflurano) y las inyecciones, tanto de los lentivirus como de los compuestos fluorescentes se hicieron en forma transcutánea, directamente en la cisterna magna, con una jeringa de 1 mL. Las ratas fueron inyectadas en P1 con una solución de partículas lentivirales con la secuencia codificante para la eGFP bajo el dominio del promotor pGK y el promotor ubicuo citomegalovirus disuelto en PBS (0.5 a 1  $\mu$ l, título de  $5 \times 10^5$  partículas virales). Los animales fueron sacrificados 7 días luego de la inyección. Cabe señalar que en algunas ocasiones, cuando el lugar de la inyección no fue el correcto, se produjo un marcado espurio por fuera de las cavidades ventriculares telencefálicas y del CC de la médula espinal.

Mediante el mismo procedimiento, otras ratas recibieron también por vía intratecal, una sustancia fluorescente que se incorpora a las células (*Cell Tracker Green* -

CMFDA, Molecular Probes; 10  $\mu$ l, 10  $\mu$ M). Las inyecciones se llevaron a cabo en P5, al día siguiente se realizó la lesión compresiva, finalmente los animales se sacrificaron en P8.

Teniendo en cuenta que el agente marcador es transportado en todos los casos por el líquido cefalorraquídeo esta estrategia experimental solo permite visualizar únicamente aquellas células que al menos en algún momento contactaron el CC. Además, si migrasen, sería posible conocer sus trayectorias y destinos finales. En el caso de las inyecciones lentivirales es posible efectuar una posterior amplificación inmunocitoquímica a fin de mejorar la intensidad de la señal de la proteína reportera.

## **2.6 Registros electrofisiológicos**

Los registros electrofisiológicos se realizaron en colaboración con el Lic. Nicolás Marichal, integrante del mismo grupo de trabajo. La preparación de rodajas espinales de ratas neonatales se efectuó de acuerdo al siguiente protocolo. Las ratas neonatales (P0-P8), fueron decapitadas luego de una breve inducción anestésica con pentobarbital (100 mg/kg, i.p.) El ensanchamiento lumbar fue expuesto por medio de una laminectomía y fijado entre bloques de agar para cortar rodajas transversales (200 a 300  $\mu$ m de espesor) con un micrótomo de hoja vibratoria (Microm). Las rodajas se colocaron en una cámara de registro (1 ml de volumen, SD Instruments) evitando que flotaran con un ancla de platino cruzada por hebras de Lycra. Cada rodaja fue inmersa y bañada por un flujo continuo (velocidad de 1 ml/min) de una solución de Ringer compuesta por: NaCl 124mM; KCl 2.4 mM; MgSO<sub>4</sub> 1.3 mM; NaHCO<sub>3</sub> 26 mM; HEPES 1.25 mM; CaCl<sub>2</sub> 2.4 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM; glucosa 10 mM; pH 7,4. Para los registros, las rodajas se mantuvieron a temperatura ambiente (20-22 °C). Durante la disección y la obtención de las rodajas el tejido fue enfriado (entre 4-6 °C), inmerso en Ringer con alta concentración de Mg<sup>2+</sup> (18.7 mM) y baja concentración de Ca<sup>2+</sup> (1 mM). Luego de 30 min en esta solución, las rodajas fueron transferidas a una solución de Ringer de composición normal.

### **3. RESULTADOS**

#### **CAPÍTULO I**

#### **Características morfológicas y moleculares de las células que conforman la Gelatinosa Central**

Con el fin de lograr una identificación confiable de los diversos tipos celulares que coexisten en la GC exploramos la expresión de diversos marcadores moleculares y factores de transcripción, tanto en el epéndimo como en zonas adyacentes al mismo. En paralelo, analizamos con otros miembros del equipo las propiedades electrofisiológicas de las células que contactan la luz del CC. Mediante el uso combinado de marcadores del ciclo mitótico y de neuronas inmaduras, estudiamos la posible generación, luego del nacimiento, de las neuronas que entran en contacto con la luz del CC y están integradas a la capa celular endimaria.

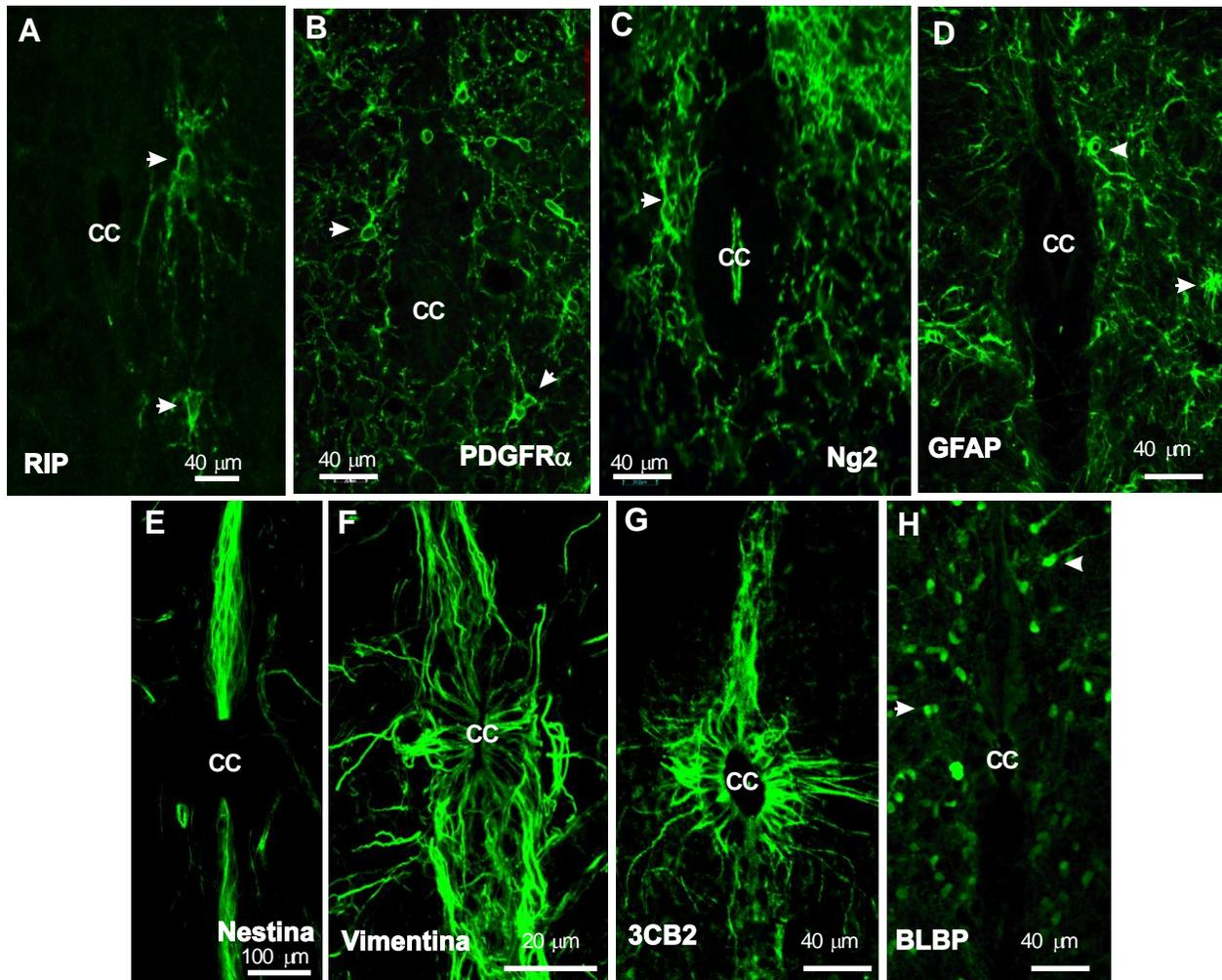
##### **3.1 En la GC coexisten varios tipos celulares**

Las técnicas inmunocitoquímicas permitieron distinguir en la GC células gliales y neuronales con morfologías y topologías diversas, particulares para cada tipo celular. Los oligodendrocitos maduros, que expresan RIP (Friedman et al., 1989), se distribuyeron por fuera de la zona endimaria, caracterizándose por su tamaño y la abundancia de prolongaciones (Fig. 3 A). También se identificaron, por fuera de la zona endimaria, abundantes células precursoras de oligodendrocitos (PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> y NG2<sup>+</sup>) (Wilson et al., 2006), las mismas fueron de menor tamaño (menores de 10  $\mu$ m) y escasas prolongaciones (Fig. 3 B-C). La presencia de estas numerosas células inmaduras puede considerarse un hecho consistente con la edad de las ratas usadas en estos experimentos (P0-P5). Completó la presencia de la estirpe glial la detección de astrocitos maduros (GFAP<sup>+</sup>) (Levitt & Rakic, 1980), generalmente alejados del CC (Fig. 3 D).

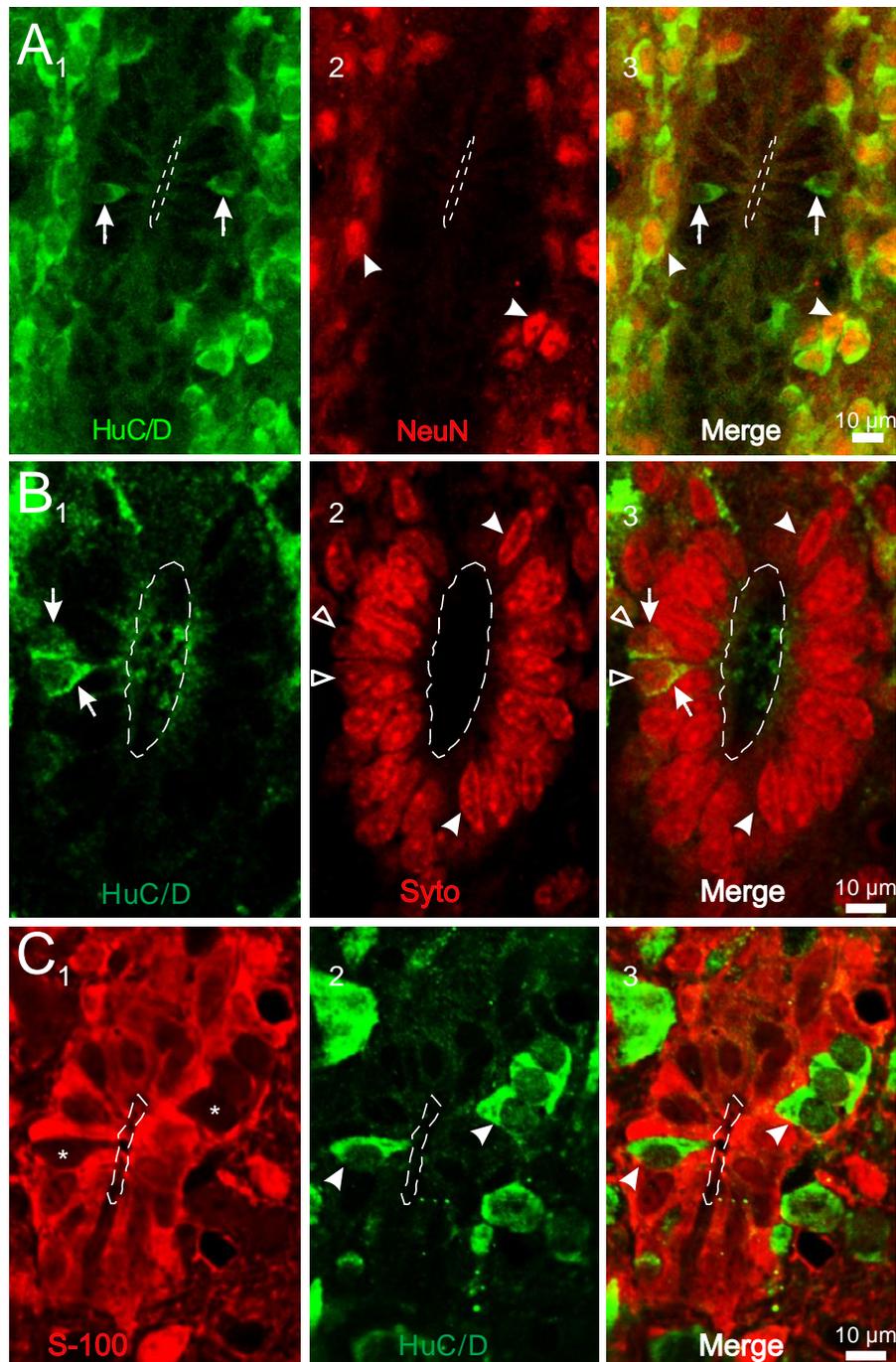
Por último, los marcadores habitualmente considerados como propios de los progenitores neuronales se expresaron en forma particularmente robusta en las células localizadas en la línea media. La nestina por ejemplo (Lendhal et al., 1990),

fue detectada mayoritariamente en células distribuidas a distintos niveles de la línea media, extendiendo sus procesos desde la luz del CC hasta la superficie pial. Cabe destacar que la expresión de esta proteína está relacionada con la edad del animal. En los primeros días de vida postnatal (P0-P2) vimos abundantes células y procesos nestina<sup>+</sup> surcando la línea media (Fig.3 E). Un análisis minucioso también reveló otras prolongaciones celulares nestina<sup>+</sup>, marcadas tenuemente que invaden los campos laterales. En paralelo con el crecimiento del animal, la expresión de nestina disminuye y queda, durante el período comprendido entre P5 y P10, confinada a una estrecha zona de la línea media (datos no ilustrados). La vimentina, otro marcador de células progenitoras neurales (Schwob *et al.*, 1986), se localizó no solo en la línea media (desde la luz del CC hasta las envolturas meníngeas), sino que se encontraron procesos bien teñidos en los campos laterales (Fig.3 F). Otros marcadores de glia radial como el 3CB2 (Prada *et al.*, 1995) y el BLBP (Feng *et al.*, 1994) mostraron patrones de expresión diferentes entre sí. La distribución de células y procesos 3CB2<sup>+</sup> fue similar al de la vimentina (Fig.3 G) mientras que la inmunodetección de la proteína BLBP mostró células relativamente pequeñas, dispersas fuera de la zona endimaria (Fig.3 H).

Tomando como criterio de clasificación el grado de diferenciación o madurez de las células de estirpe neuronal, éstas se pueden agrupar en dos poblaciones. En contacto con el fluido cerebroespinal, hallamos neuronas inmaduras, inmunorreactivas frente al marcador neuronal temprano HuC/D (Marusich *et al.*, 1994) y que no expresaron el marcador nuclear (NeuN), típico de las células nerviosas ya diferenciadas (Mullen *et al.*, 1992) (Fig.4 A 1-3). Más distante de la luz del canal y con células desconectadas del mismo, se encontró una segunda población de células nerviosas que expresaron tanto HuC/D como NeuN (Fig.4 A 3). Es interesante señalar que las células HuC/D<sup>+</sup> son una población minoritaria de la capa endimaria (Fig. 4B 1-3) y que además, no expresaron la proteína S100 $\beta$  considerado por varios investigadores (Chiasson *et al.*, 1999; Spassky *et al.*, 2005; Carlén *et al.*, 2009), un marcador de endimocitos (Fig.4C 1-3); reafirmando su carácter neuronal. La distribución de estas dos poblaciones neuronales hace pensar en la existencia de un gradiente de maduración “centro-periferia”.



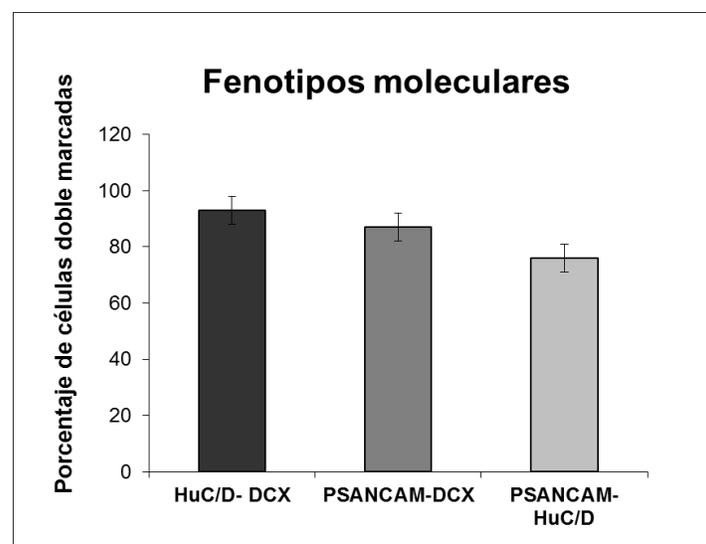
**Figura 3.** Heterogeneidad celular. Los distintos marcadores moleculares mostraron diferentes patrones de expresión.. Entre los distintos tipos de células gliales se distinguen los oligodendrocitos maduros, fuera de la zona endimaria y con abundantes prolongaciones (**A, flechas**) y sus células precursoras también por fuera de la zona endimaria (**B y C, flechas**). Se observaron además, los astrocitos en esta región (**D, flechas**). Los marcadores de célula progenitora neuronal evidenciaron una robusta expresión en la zona del rafe únicamente en el caso de la nestina (**E**) y en la zona de la línea media y desde el CC hacia los aspectos laterales en el caso de la vimentina (**F**). Los marcadores de Glia Radial, 3CB2 y BLBP mostraron patrones de expresión diferentes, el del 3CB2 (**G**) fue similar al de la Vimentina mientras que el BLBP evidenció células por fuera de la zona endimaria (**H, flechas**)



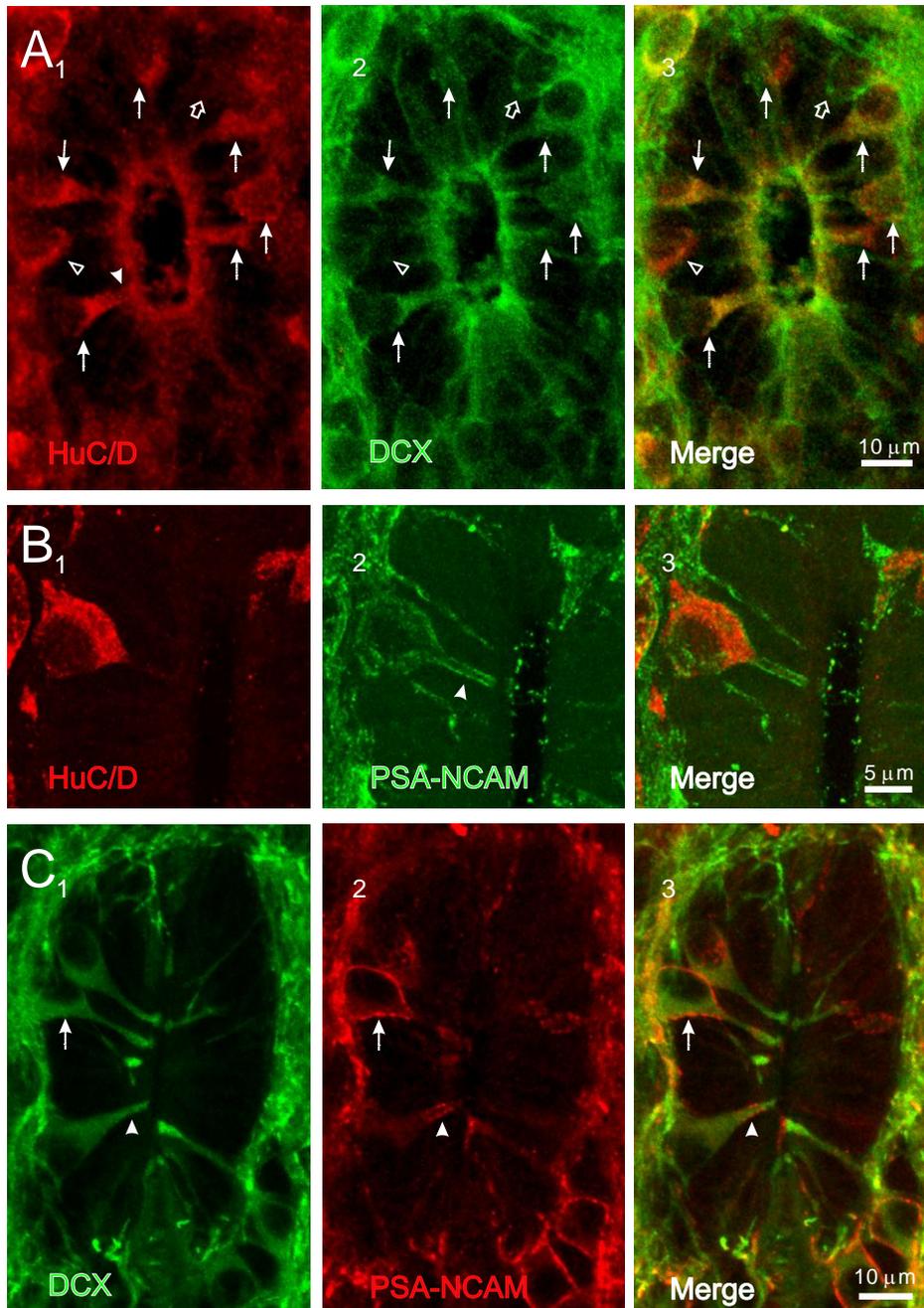
**Figura 4.** Neuronas inmaduras contactando el CC **A1-3**, (1) Células HuC/D+ (flechas) en contacto con el CC. Ninguna célula NeuN se encontró en la capa endimaria (2). Por fuera de la zona endimaria las células HuC/D+ presentaron núcleos NeuN+ (3). Las cabezas de flecha en 2 y 3 señalan dos células HuC/D+ cercanas a la capa endimaria con núcleo NeuN+. **B1-3**, Células HuC/D+ (1, flechas) con el núcleo marcado con Syto 64 (2) en el epéndimo. Las células HuC/D+ son una minoría de las células que conforman la capa endimaria (3) y sus núcleos son redondeados (2, 3, cabeza de flecha abierta) lo que contrasta con los núcleos elongados (2, 3, cabeza de flecha llena) de la mayoría de las células de la capa endimaria. **C1-3**, La mayoría de las células del epéndimo expresaron el marcador de célula endimaria S100 $\beta$  (1) excepto aquellas células HuC/D+ (2, 3, cabeza de flecha). Tomado de Marichal *et al.*, 2009.

### 3.2 Algunas células conectadas al CC poseen proteínas vinculadas a la migración

En los nichos neurogénicos del cerebro de mamíferos adultos la expresión de DCX y PSA-NCAM es considerada característica de las neuronas inmaduras con capacidad de migrar (Seki, 2002; Brown et al., 2003; Alonso, 1999). En la médula espinal los experimentos de doble marcado mostraron que la casi totalidad de las células HuC/D<sup>+</sup> también expresaron DCX (104 en un total de 105) (Fig. 6 A 1-3). También hallamos, unas pocas células que expresaron DCX pero no HuC/D (7 en un total de 111). Se debe señalar que un buen número de células HuC/D<sup>+</sup> también expresaron la proteína PSA-NCAM (38 en un total de 46) (Fig. 6 B 1-3). Finalmente, otros experimentos de doble marcado, mostraron que la mayoría de las células DCX<sup>+</sup> fueron inmunorreactivas frente al anticuerpo PSA-NCAM (61 en un total de 67) (Fig. 6 C 1-3). Estos datos revelaron un cierto grado de heterogeneidad en la población de células consideradas neuronas inmaduras (Fig. 5). La presencia de la maquinaria proteica necesaria para migrar sugiere que estas células podrían movilizarse e integrarse a los circuitos neuronales pre-existentes, especialmente cuando así lo ameriten diversos tipos de injuria.



**Figura 5.** Análisis cuantitativo de la coexpresión de los tres marcadores de neuronas inmaduras en las células que contactan el CC.

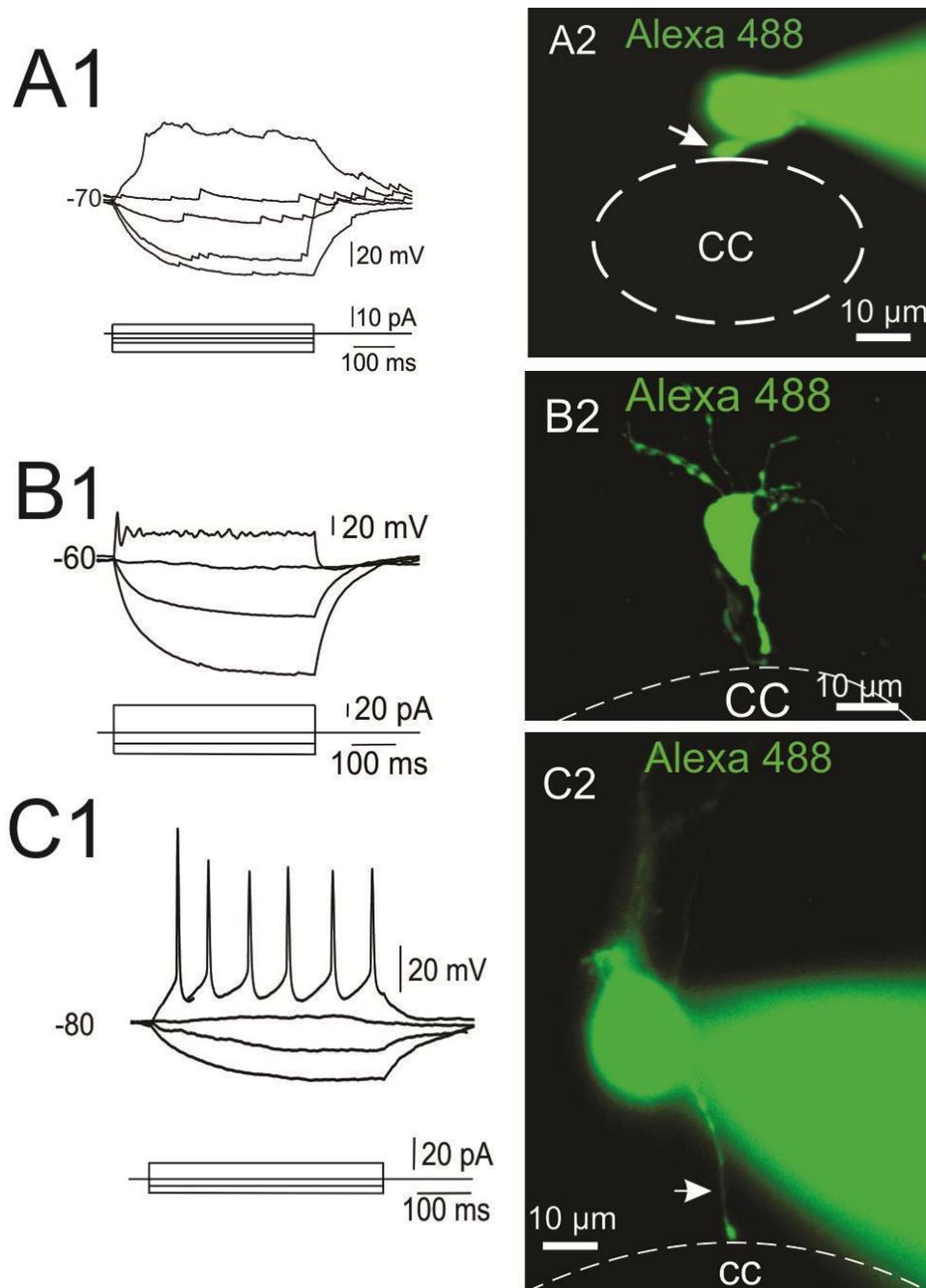


**Figura 6.** Las células HuC/D+ expresan proteínas propias de los neuroblastos presentes en los nichos neurogénicos. **A1-3,** Las células HuC/D+ rodeando al CC (**1**, flechas) presentan un proceso apical en contacto con la luz del canal (**1**, cabeza de flecha). La expresión de DCX (**2**) coincidió casi completamente con la de HuC/D (**2** y **3**, flechas). De todos modos algunas células HuC/D+ no expresaron DCX (**1-3**, cabeza de flechas vacías) y otras pocas DCX+ no fueron inmunorreactivas para HuC/D (**1-3**, flecha vacía). Plano óptico de células HuC/D+ **B1-3,** Las células HuC/D+ (**1**) expresaron además PSA-NCAM, (**2**, **3**). Nótese el patrón específico de expresión de la PSA-NCAM en la superficie de la célula (cabeza de flecha en **2**). Superposición de cortes ópticos en Z. **C1-3,** La mayoría de las células DCX+ (**1**, flecha) también expresaron PSA-NCAM (**2** y **3**). Nótese el proceso apical conspicuo llegando a la luz del CC (cabeza de flecha). Tomado de Marichal *et al.*, 2009.

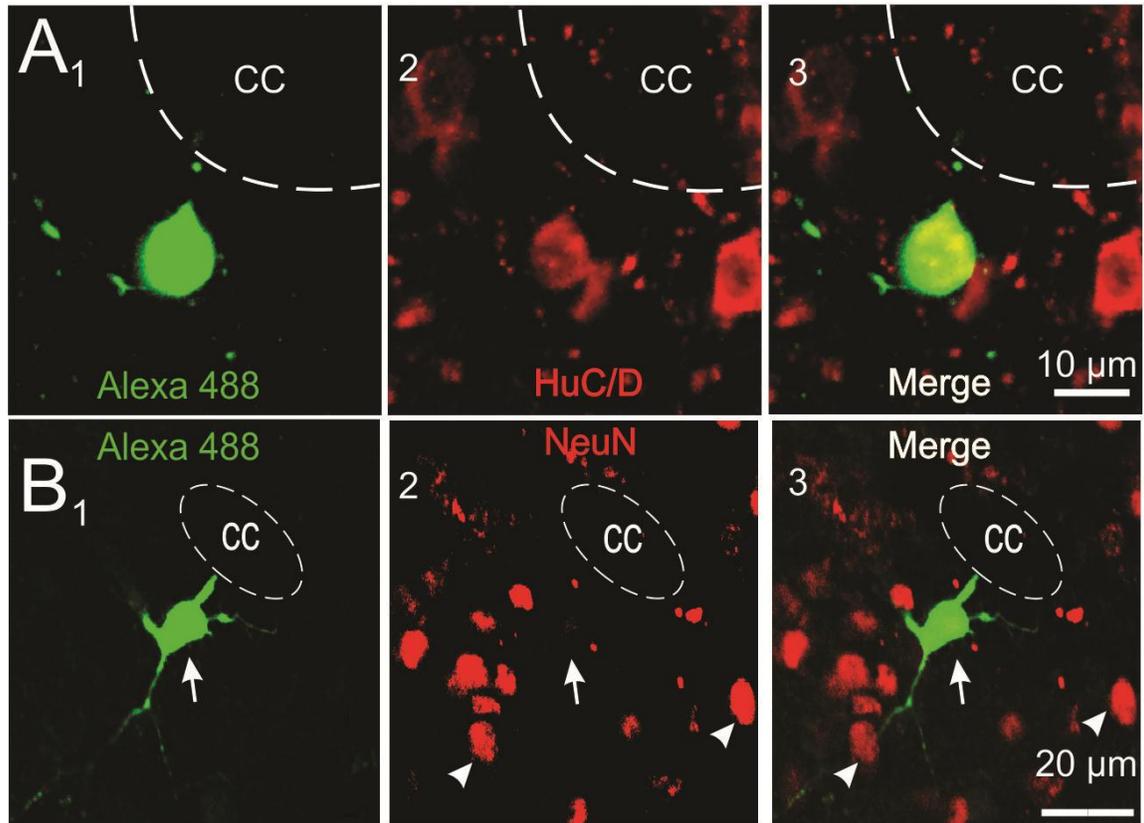
### 3.3 Diversos fenotipos electrofisiológicos en las células conectadas al CC

Los registros electrofisiológicos se obtuvieron en la modalidad de “*whole cell patch clamp*”. En estos experimentos la pipeta de registro contenía biocitina y/o fluoróforos para posibilitar la visualización de las células durante la exploración funcional y su ulterior análisis morfológico. Se hallaron dos tipos principales de células, unas con bajas resistencias de entrada y respuestas pasivas a la despolarización; otras se caracterizaron por tener resistencias altas y capacidad para generar respuestas activas. Dentro de estas últimas, se distinguieron tres fenotipos electrofisiológicos. Por un lado, células que generaron respuestas lentas mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$  (resistentes a la TTX y bloqueadas por  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Ni}^{2+}$ ) frente a pulsos de corriente despolarizantes (Fig. 7 A1-2), por otro, células capaces de generar espigas de  $\text{Na}^+$  (bloqueadas por TTX), generalmente únicas (Fig. 7 B1-2), en tanto un tercer grupo generó espigas de corta duración en forma repetitiva (Fig. 7 C1-2).

El fenotipo morfológico revelado por la inyección de cromógenos o fluoróforos fue en el caso de las células pasivas concordante con los diversos tipos y subtipos englobados bajo los términos genéricos referentes a ependimocitos o glias radiales. En cambio, las células de descarga única presentaron morfologías similares a las mostradas por los marcadores inmunocitoquímicos de neuronas inmaduras, expresando HuC/D (Fig. 8 A1-3). Las células con características electrofisiológicas de neuronas ya diferenciadas, pese a exhibir un árbol neurítico más desarrollado, tampoco expresaron el marcador NeuN (como ya se adelantó, propio de neuronas maduras) (Fig. 8 A1-3).



**Figura 7.** Fenotipos funcionales de células contactando el CC. **A1** Respuesta activa mediada por  $\text{Ca}^{+2}$  en una célula que contacta el CC. Pulsos de corriente despolarizante produjeron un potencial lento. **A2** Como lo reveló la inyección de Alexa 488, la célula presentó un proceso único corto en contacto con el CC (flecha, epifluorescencia convencional). **B1** Respuesta de una célula del epéndimo frente a una serie de pulsos de corriente, presentó una descarga única mediada por  $\text{Na}^+$ . **B2** Nótese que el cuerpo celular está conectado al CC por un proceso único y diversas neuritas cortas que surgen del polo basal (Imagen confocal). **C1** Célula contactando el CC con una descarga de espigas de  $\text{Na}^+$  repetitiva más robusta. **C2** La epifluorescencia convencional mostró que esta célula aún estaba conectada al CC por un único proceso delgado (flecha). Adaptado de Marichal *et al.*, 2009.



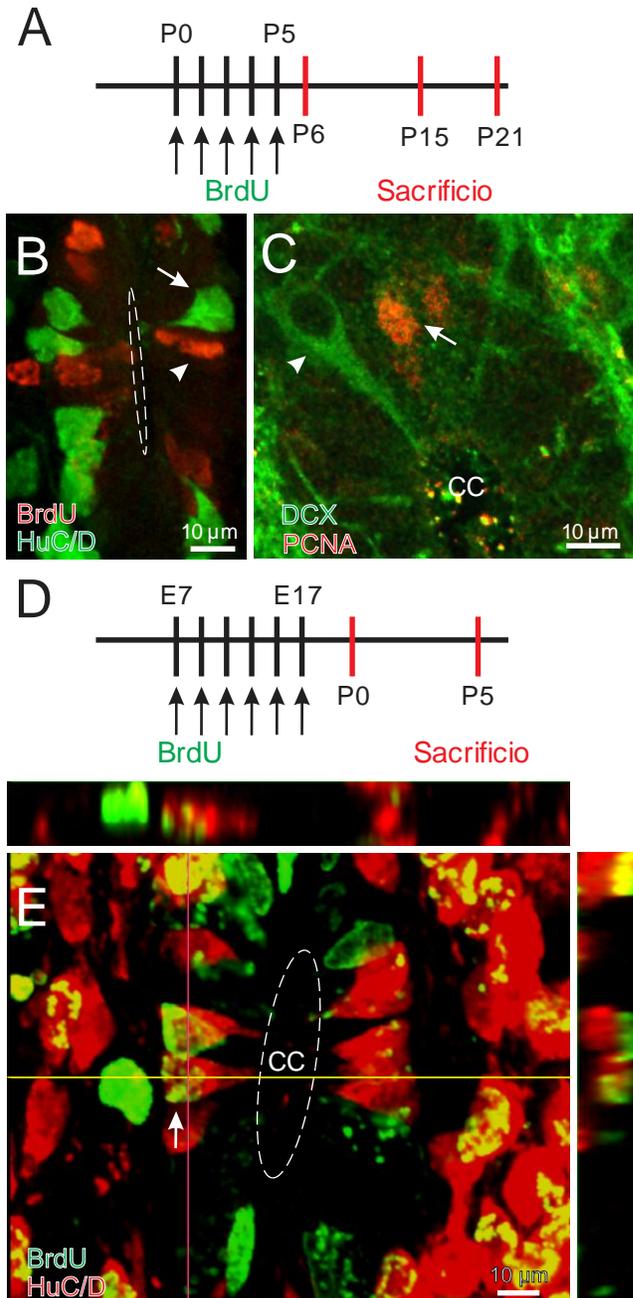
**Figura 8.** Fenotipo molecular de células de descarga de Na<sup>+</sup>. **A** A modo de ejemplo se muestra una célula registrada de espiga única (**1**) que expresó HuC/D (**2, 3**) y una célula con fenotipo de descarga repetitiva (**B1**, flecha) conectada al CC por un proceso único y con neuritas bien desarrolladas. Pese a haber muchos núcleos inmunorreactivos para el NeuN (**B2**, cabeza de flecha) esta célula no lo fue (**B2, 3**, flecha). Adaptado de Marichal *et al.*, 2009.

### 3.4 Las neuronas inmaduras que contactan al CC se originan durante el período embrionario

Dadas las características de inmadurez de las neuronas conectadas al CC, nos planteamos la posibilidad de que fuesen generadas durante ciclos neurogénicos post-natales. Para aceptar o descartar dicha hipótesis, utilizamos la incorporación nuclear del BrdU como indicador del inicio del ciclo mitótico (fase S). Empleamos un protocolo experimental consistente en la inyección parenteral de BrdU (100 mg/kg diarios de P0 a P5) y el sacrificio de los animales en tres momentos diferentes de su desarrollo (P6, P15 y P21) tal cual se ilustra en el esquema incluido en la figura 8 A. Los resultados de estos experimentos no mostraron, en ninguna de las escalas temporales estudiadas, células HuC/D<sup>+</sup> con núcleos marcados por el BrdU (Fig. 9B). Se debe destacar además, que estas células tampoco expresaron PCNA (marcador general de células proliferantes a lo largo de la mayor parte del ciclo) (Fig. 9C). Sin embargo, cuando se efectuaron inyecciones de BrdU durante la vida embrionaria (E7 a E17) y se exploró la incorporación del fármaco durante períodos idénticos a los empleados en los experimentos con animales neonatales, se encontraron células HuC/D<sup>+</sup> con núcleos que habían incorporado BrdU durante la vida intrauterina (Fig. 9D-E). Ambos resultados experimentales excluyen la posibilidad de la génesis postnatal de estas neuronas e indican su origen durante la vida embrionaria.

Los resultados descritos anteriormente (desde 3.1 hasta 3.4) han sido publicados en *The Journal of Neuroscience*: Marichal N., **García G.**, Radmilovich M., Trujillo-Cenóz O., Russo R.E. (2009) Enigmatic Central Canal Contacting Cells: Immature Neurons in “Standby Mode”? *J. Neurosci.* 29(32):10010 –10024.

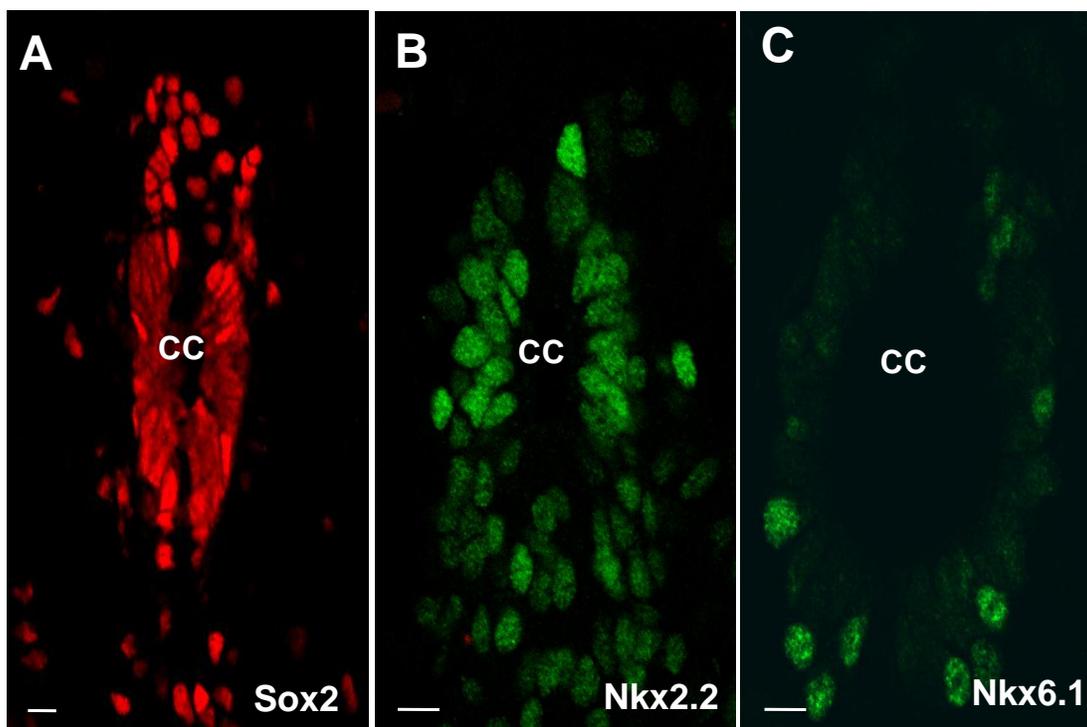
Los resultados que se describen a continuación (salvo el numeral 3.5) forman parte de un trabajo que se encuentra en las etapas finales de edición y en el cual figuraré como segunda autora. Por último, los datos restantes (Capítulo 2) son parte de un tercer trabajo que se encuentra en las etapas iniciales de elaboración del texto y del cual soy primer autora.



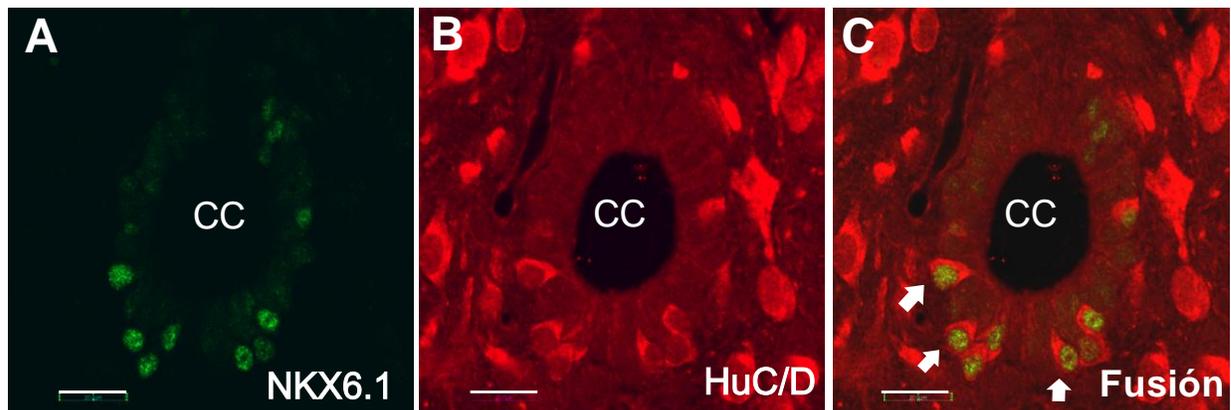
**Figura 9.** Determinación del momento de nacimiento de las neuronas que contactan el CC. **A**, Protocolo de inyección de BrdU para testear la generación de neuroblastos contactando el CC en la vida postnatal temprana. **B**, Doble marcado para HuC/D y BrdU en P15. Aunque muchas células endimarias proliferaron (cabeza de flecha), ninguna colocalizó con el marcador neuronal temprano HuC/D (flecha). Superposición de secciones ópticas en Z. **C**, Algunas células endimarias fueron positivas para el marcador de ciclo celular PCNA (flecha) pero no colocalizaron con el DCX (cabeza de flecha). Plano confocal único. **D**, Protocolo de inyección de BrdU para determinar la generación de estas células en la vida embrionaria. **E**, En ratas neonatales inyectadas entre E7–E17 y sacrificadas entre P0 y P5 algunas células HuC/D+ mostraron núcleos que incorporaron BrdU (flecha en el panel central y planos ortogonales). Superposición de secciones ópticas. **C**, **E**, rata P2. Tomado de Marichal *et al.*, 2009.

### 3.5 La GC mantiene la expresión de factores de transcripción embrionarios y uno de célula madre neural.

La presencia de células que expresan factores de transcripción, es otro indicador de las trazas de inmadurez que persisten en la GC como esbozos de su linaje ligado al tubo neural embrionario. Es así que las técnicas inmunocitoquímicas permitieron detectar la expresión de factores de transcripción tales como el Nkx6.1 y el Nkx2.2, además de un marcador temprano de célula madre neural (Sox2) (Graham et al., 2003) (Fig. 10 A-C). Durante el desarrollo el Nkx6.1 participa en la generación de motoneuronas (Sander et al., 2000), mientras que el Nkx2.2 regula la formación de interneuronas y la diferenciación de los oligodendrocitos (Briscoe et al., 1999; Watanabe et al., 2004). Otros factores de transcripción tales como el PAX6 o el PAX7 no fueron detectados (a pesar de que lo fueron cuando los mismos anticuerpos se ensayaron en material embrionario). Consistente con la propuesta inmadurez de las células HuC/D<sup>+</sup>, éstas demostraron inmunorreactividad frente al anticuerpo anti-Nkx6.1 (Fig. 11 A-C).



**Figura 10.** Diversos factores de transcripción embrionarios se expresan en la zona pericanal. Se distinguen abundantes núcleos Sox2<sup>+</sup> alrededor del CC y algunos dispersos, mayoritariamente hacia la zona ventral y los laterales (A). El Nkx2.2 se detectó alrededor del CC y en la zona ventral al mismo (B). Los núcleos Nkx6.1<sup>+</sup> en cambio, fueron mucho menos abundantes y se localizaron alrededor del CC con una leve dispersión ventral (C). La barra de calibración corresponde a 10µm.



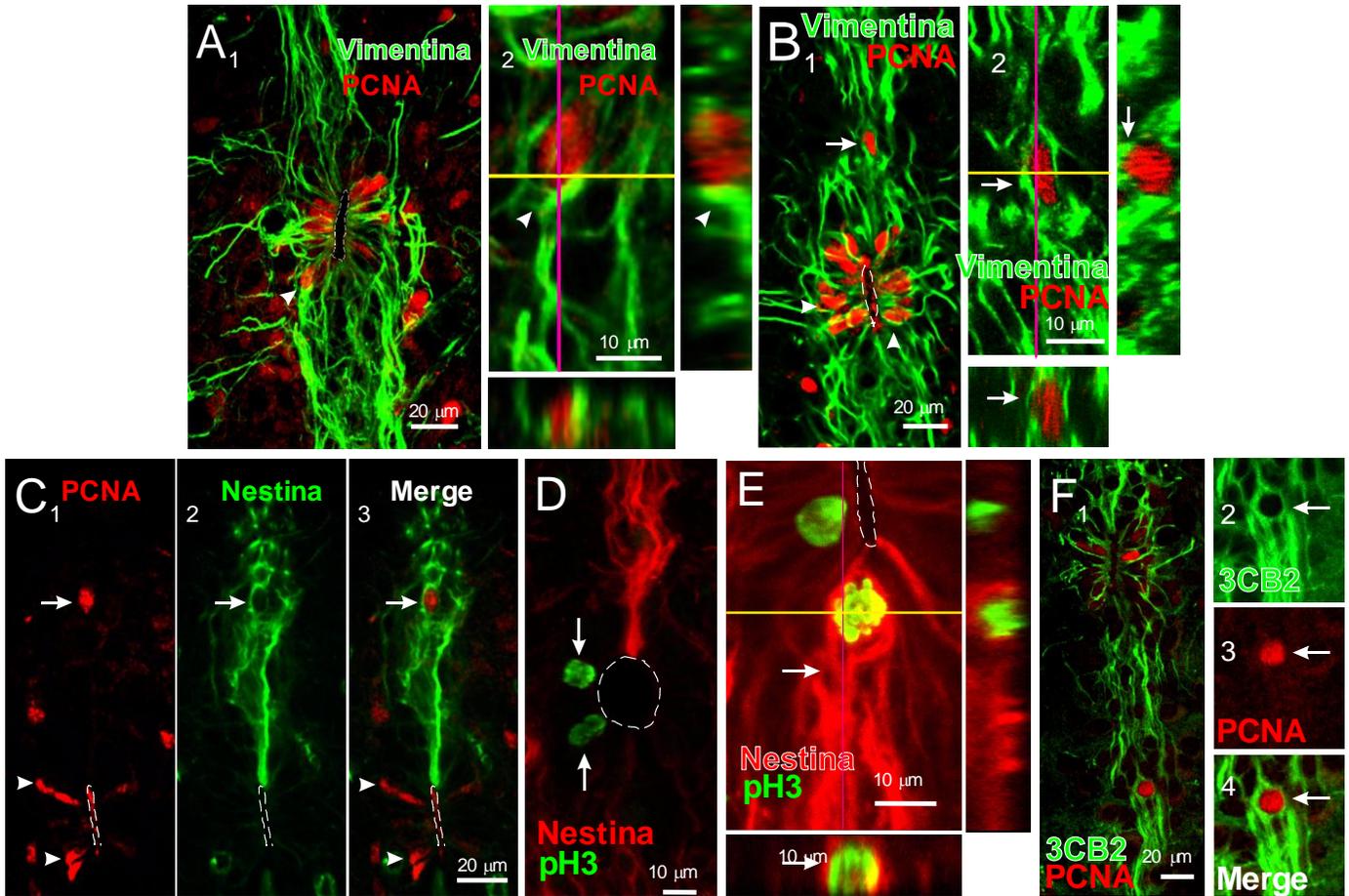
**Figura 11.** Las células HuC/D+ conectadas al CC expresaron Nkx6.1. **(A)** Patrón de expresión del factor Nkx6.1, **(B)** células HuC/D+ en la zona pericanal y **(C, flechas)** coexpresión de ambos marcadores. La barra de calibración corresponde a 20  $\mu$ m.

### 3.6 En la GC persisten células progenitoras con capacidad para proliferar durante la vida post-natal

El análisis de la expresión del marcador nuclear de célula proliferante PCNA (Bolton et al., 1994) reveló una gran cantidad de células ubicadas mayoritariamente en los campos laterales del CC. Si bien fueron las regiones laterales las que mostraron el mayor número de células proliferantes, también encontramos algunos núcleos PCNA a lo largo de la línea media.

Cuando el PCNA fue combinado con nestina o vimentina (marcadores de progenitores neuronales) constatamos la presencia de abundantes células con marcación doble. La mayoría de las células vimentina<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> se ubicaron en los campos laterales de la región pericanal (Fig 12 A1-2), en tanto hallamos menos células doblemente marcadas en la línea media (Fig. 12 B1-2) Por el contrario las células nestina<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup>, se localizaron únicamente en la línea media (Fig. 12 C1-3). También combinamos la detección de nestina con la de la histona fosforilada (pH3) que es específica para la fase G2 tardía y la fase M (Henzel et al., 1997). Con ese protocolo experimental identificamos algunas células doble marcadas en la región de la línea media pero no en los campos laterales (Fig. 12 D-E). Por último, se observaron células 3CB2<sup>+</sup>/PCNA<sup>+</sup> tanto en la zona endimaria lateral como en la zona de la línea media, más lejos de la luz del CC (Fig. 12 F1-4).

Se puede concluir que estos datos soportan la hipótesis que propone la presencia de células progenitoras que mantienen actividad mitótica, localizadas en la GC. Es importante mencionar que también se demostró que las neuronas inmaduras conectadas al CC no presentan capacidad proliferativa durante la vida postnatal ya que no expresaron PCNA.



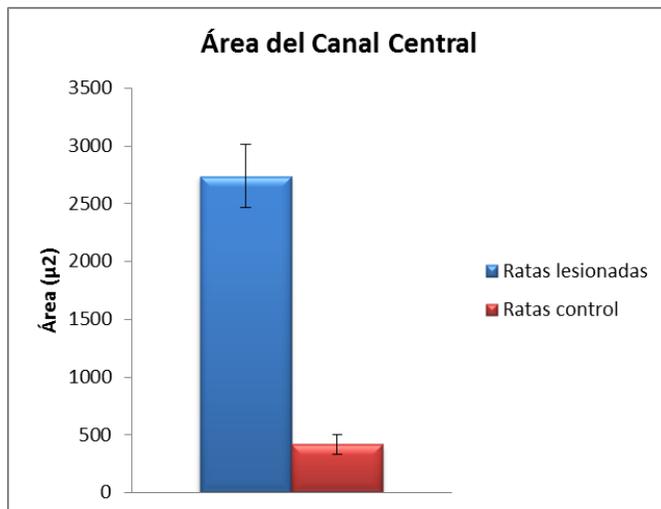
**Figura 12.** Algunas de las células vimentina+, nestina+ y 3CB2+, exhiben capacidad proliferativa. En las partes laterales del CC se observaron células vimentina+/PCNA+ (**A1, cabeza de flecha; C1, cabeza de flecha**), a mayor magnificación se muestran los planos ortogonales (**A2**). En la línea media, lejos de la luz del CC se distinguen núcleos PCNA+ de células vimentina+ que se proyectan desde la luz del CC a la superficie pial (**B1, flecha; a mayor magnificación, B2**). Las células nestina+/PCNA+ se ubicaron únicamente en la zona de la línea media (**C1, 2 y 3 flecha**), en los aspectos laterales del CC se distinguieron núcleos PCNA+ que no colocalizaron con nestina (**C1, 2 y 3 cabezas de flecha**). En las cercanías de la luz del CC se destacaron núcleos pH3+ de células nestina+ (**D**), los núcleos más laterales pH3+ en la zona endimaria fueron nestina- (**E**). Por último, se observaron células 3CB2+/PCNA+ tanto en la zona endimaria lateral (D1, cabeza de flecha) como en la zona de la línea media, más lejos del lumen del CC (**F1, flecha; a mayor magnificación, F2, 3 y 4**).

## **4. CAPÍTULO II Cambios frente a una lesión por compresión**

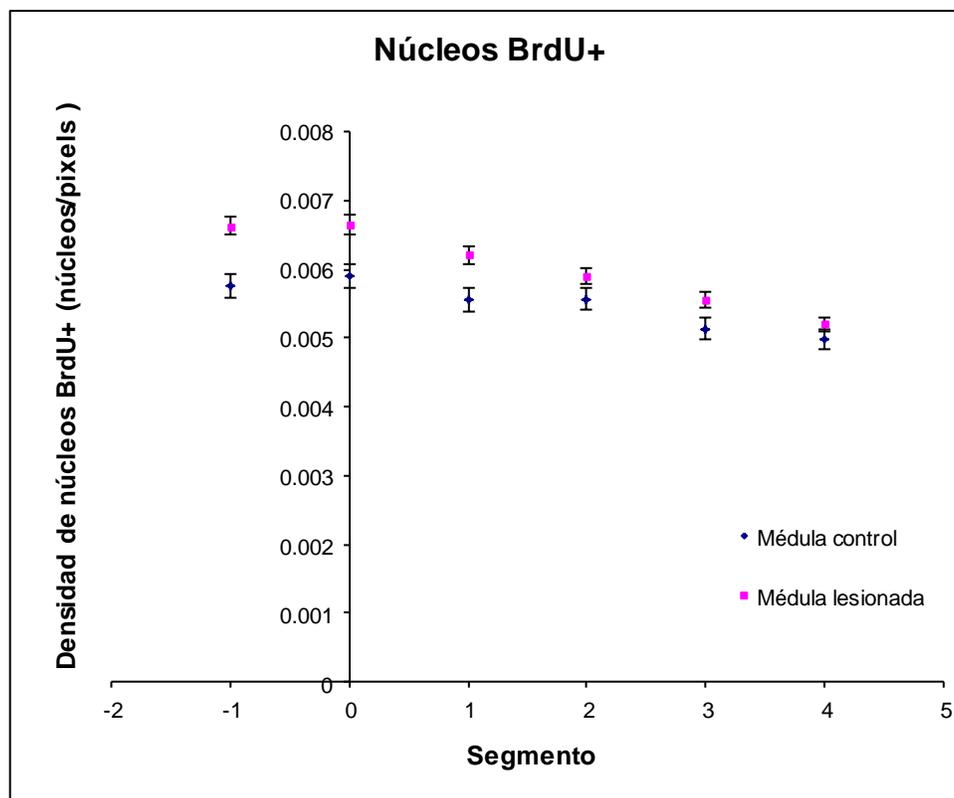
### **4.1 Descripción y caracterización de la lesión**

Por no existir antecedentes similares en la bibliografía, la optimización del modelo de lesión por compresión, en ratas neonatales fue un trabajo arduo. El primer problema que hubo que resolver fue el de la sobrevida, ya que las secciones espinales a niveles cervicales provocaban un alto índice de mortalidad. Se optó entonces por un procedimiento de compresión a nivel lumbar. Es importante mencionar que a diferencia de otros tipos de lesión que laceran el tejido, la compresión si bien lo daña, produce un daño más difuso, difícil de localizar exactamente en una zona específica de la médula. El segundo reto fue evitar el canibalismo, ya que las ratas eliminan así a las crías lesionadas. Se hizo necesario entonces un minucioso cuidado post lesión manteniendo los animales lejos de la madre y alimentándolos manualmente. Para estimar el grado de la lesión analizamos tres aspectos morfo-histológicos descritos en otros modelos de lesión medular: a) la dilatación del canal (Radocijic et al., 2007) (Fig. 13), b) el aumento de proliferación celular (Adrian & Walker 1962; Liu et al. 1998, 2000; Mothe & Tator 2005; Vessal et al. 2007; Meletis et al. 2008) (Fig. 14) y c) la presencia de engrosamientos axónicos con las características de conos de crecimiento o bulbos de retracción (Ramón y Cajal, 1913 -1914) (Fig. 15).

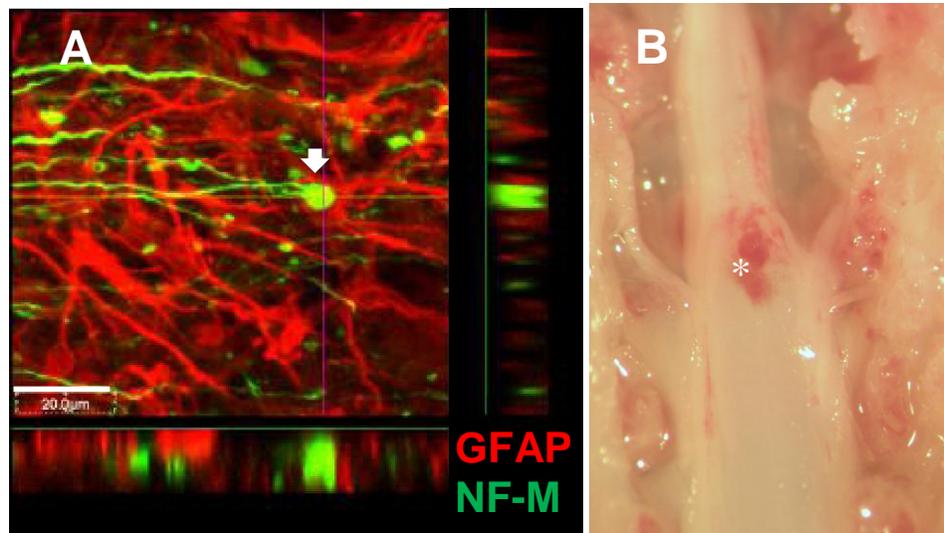
Tratamos además de evaluar los cambios a nivel comportamental, pero dado que no existen ensayos de este tipo para animales neonatales y que éstos no presentan aún un patrón de locomoción, no fue posible analizar estos aspectos en forma rigurosa.



**Figura 13.** Gráfico comparativo entre los promedios de las áreas de los canales medidos en 5 cortes transversales del segmento 0 de ratas lesionadas (n=5) y control (n=5), este segmento mide 4 mm y contiene al epicentro de la lesión. La diferencia entre ambos grupos fue significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 14.** Densidad de núcleos por píxeles, se compara el promedio de núcleos BrdU+ en 10 cortes transversales de cada segmento medular (4 mm c/u) de animales lesionados (n=5) y de animales control (n=5). El epicentro de la lesión corresponde al segmento 0, los valores positivos refieren a los segmentos rostrales y los negativos a los caudales. La diferencia fue significativa sólo en los segmentos 0 y -1 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 15.** **A,** Se observa un engrosamiento axónico (flecha) rodeado por abundantes células astrocíticas (GFAP+). **B,** Vista macroscópica del lugar de la lesión, a los tres días de realizada la misma, sólo se distingue una leve hemorragia (asterisco).

## 4.2 Identificación de las células proliferantes luego de la lesión

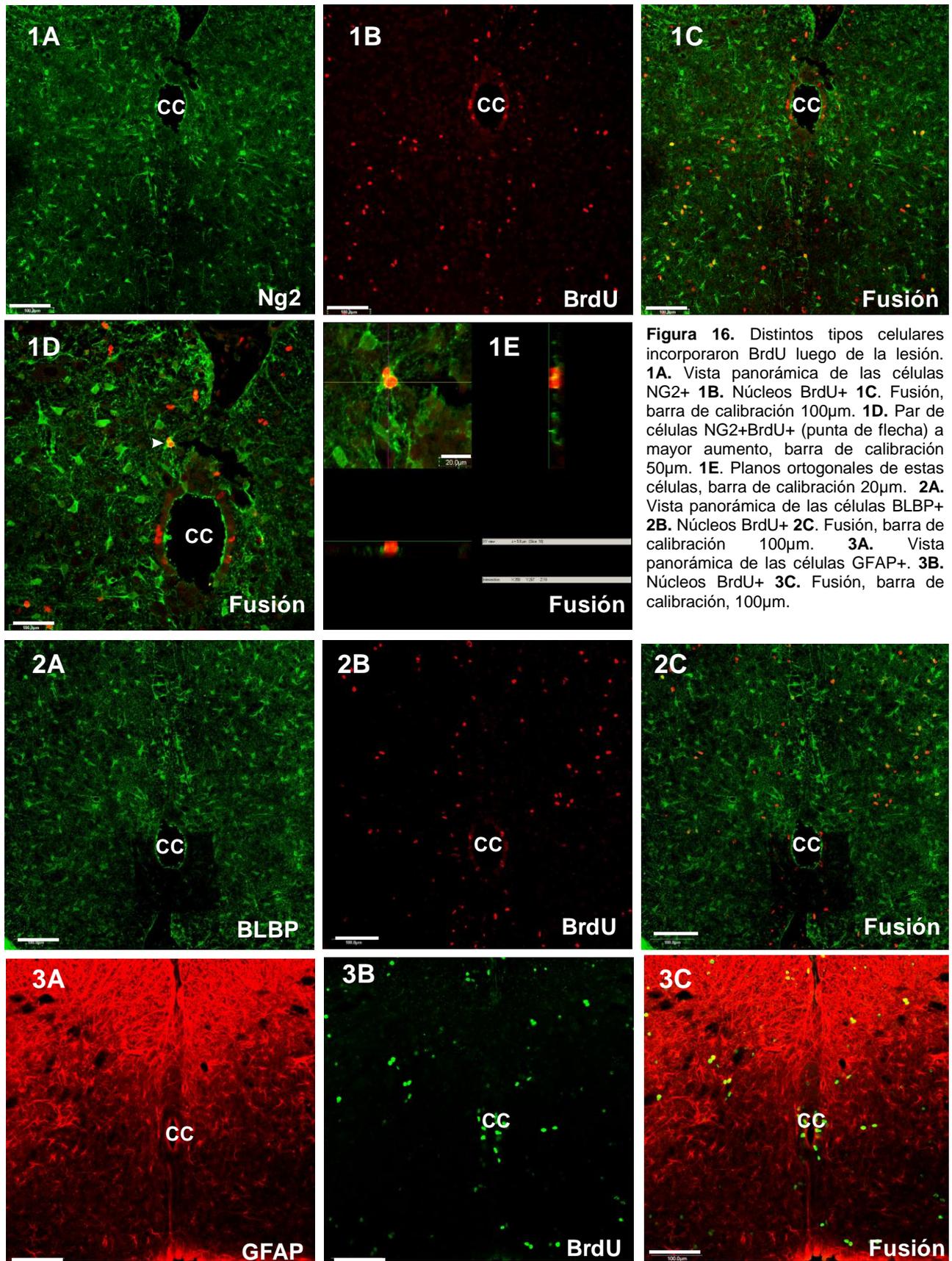
Fue motivo de particular interés cuantificar las células ciclantes en animales normales, determinar sus fenotipos moleculares y analizar los posibles cambios inducidos por la lesión. Con estos fines se compararon el número y características moleculares de células en animales que recibieron BrdU y fueron luego sacrificados (control), con animales que recibieron BrdU, fueron lesionados y finalmente sacrificados. Tal cual se mostró en el gráfico 3 existe un aumento de proliferación como respuesta a la compresión pero resta analizar otros cambios más sutiles que ocurren en la GC como consecuencia de la lesión.

### 4.2.1 La lesión modifica las proporciones de las distintas estirpes de células ciclantes.

Tanto en las células de los animales control como en los lesionados la mayoría de las células proliferantes expresaron marcadores existentes en los precursores de oligodendrocitos (NG2<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>). Sin embargo, en la población lesionada esta estirpe celular aumentó aproximadamente un 10%. También fue particularmente notorio el aumento en los animales lesionados, de las células que expresaron GFAP (se duplicaron) y menos significativo el aumento de la expresión de proteínas tales como el BLBP y PDGFR  $\alpha$ . Se han incluido en la figura 16 algunas de las imágenes que posibilitaron la cuantificación incluida en la tabla 2. Merece una mención especial la aparición en los animales lesionados de un fenotipo molecular ausente en los controles: unas muy pocas células DCX<sup>+</sup> que incorporaron BrdU (este hecho será analizado más adelante).

	LESION	CONTROL
Marcador Molecular	Porcentaje de células BrdU <sup>+</sup> (%) $\pm$ SD	Porcentaje de células BrdU <sup>+</sup> (%) $\pm$ SD
BLBP	23 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1
NG2	34 $\pm$ 2	24 $\pm$ 1
PDGFR $\alpha$	29 $\pm$ 1	27 $\pm$ 1
GFAP	14 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1,5
DCX	2,5 $\pm$ 0,5	0

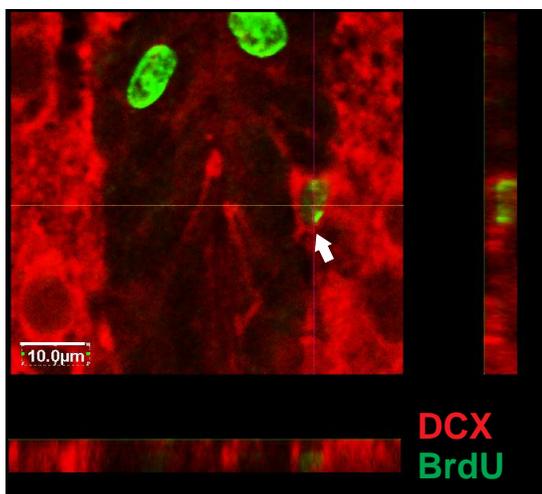
**Tabla 2.** Valores porcentuales de células de estirpe glial y neuronal que incorporaron BrdU en el segmento 0 que contiene al epicentro de la lesión y su equivalente (control).



**Figura 16.** Distintos tipos celulares incorporaron BrdU luego de la lesión. **1A.** Vista panorámica de las células NG2+ **1B.** Núcleos BrdU+ **1C.** Fusión, barra de calibración 100µm. **1D.** Par de células NG2+BrdU+ (punta de flecha) a mayor aumento, barra de calibración 50µm. **1E.** Planos ortogonales de estas células, barra de calibración 20µm. **2A.** Vista panorámica de las células BLBP+ **2B.** Núcleos BrdU+ **2C.** Fusión, barra de calibración 100µm. **3A.** Vista panorámica de las células GFAP+ **3B.** Núcleos BrdU+ **3C.** Fusión, barra de calibración, 100µm.

#### 4.2.2 Algunas pocas células DCX+ incorporaron BrdU luego de la lesión

Como ha sido descrito en el capítulo I de resultados por medio de exhaustivos experimentos de inyección de BrdU en el período comprendido entre P0 y P5, las células DCX+ nacen en la vida embrionaria (Marichal et al., 2009). Sin embargo luego de lesiones por compresión se observaron algunas células DCX<sup>+</sup> cuyos núcleos habían incorporado BrdU<sup>+</sup> (Fig. 17). Interpretamos la incorporación de BrdU por parte de neuronas inmaduras como un cambio cualitativo interesante, producto de la compresión.



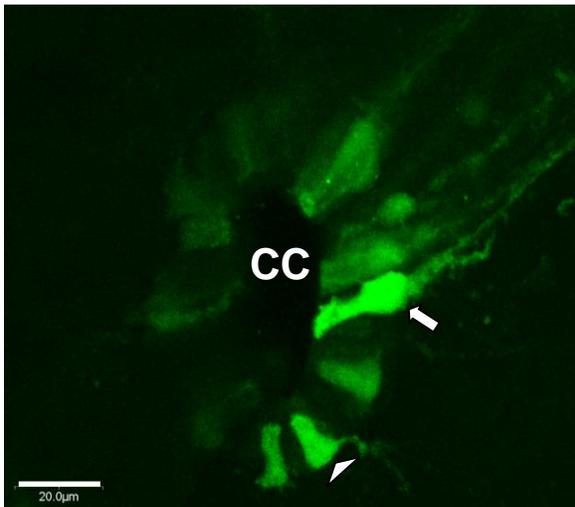
**Figura 17.** Planos ortogonales de una célula conectada al CC que incorporó BrdU luego de la lesión, la flecha indica el núcleo.

### **4.3 Mercado de las células que rodean el CC y su posible movilización post lesión**

El marcado selectivo de las células conectadas al CC es un aspecto clave en cualquier intento de verificar la hipótesis que postula a las células endimarias como protagonistas principales en los fenómenos de respuesta al daño (migración hacia el sitio de la lesión). Al encarar este problema se deben tener en cuenta, entre otros, la elección del agente marcador y la precisión de su inyección en un lugar que excluya la generación de señales espurias.

#### **4.3.1 Intentos de utilización de un lentivector para el marcado selectivo de las células que contactan el CC**

En el caso de las inyecciones lentivirales, las mismas fueron realizadas en la Cisterna Magna (CM) el día del nacimiento de los animales (P0) y los mismos fueron sacrificados ocho días más tarde (P8). Este protocolo incluye el tiempo suficiente para la infección y expresión de la proteína verde fluorescente (GFP). El lentivirus inyectado contenía el promotor ubicuo Pgk (Fosfogliceraldehído quinasa) marcando por igual células gliales y neuronales. Si bien se obtuvo el marcado celular esperado- únicamente células conectadas al CC- (Fig. 18) no conseguimos que el agente viral alcanzara el nivel de la médula donde se localizaba la lesión. Esta dificultad pudo tener su origen en el bajo título lentiviral, o en el corto tiempo transcurrido entre la inyección y la fijación. Por esta razón se continuaron los experimentos con *Cell Tracker Green*, tal cual se detalla en los numerales siguientes.



**Figura 18.** En condiciones normales, ocho días post inyección lentiviral se observan únicamente las células GFP+ rodeando al canal central. El lentivirus infectó dos tipos celulares diferentes, uno característico de glía radial (flecha) y otro de tipo neuronal en el cual se observa el primer segmento de un posible axón (cabeza de flecha).

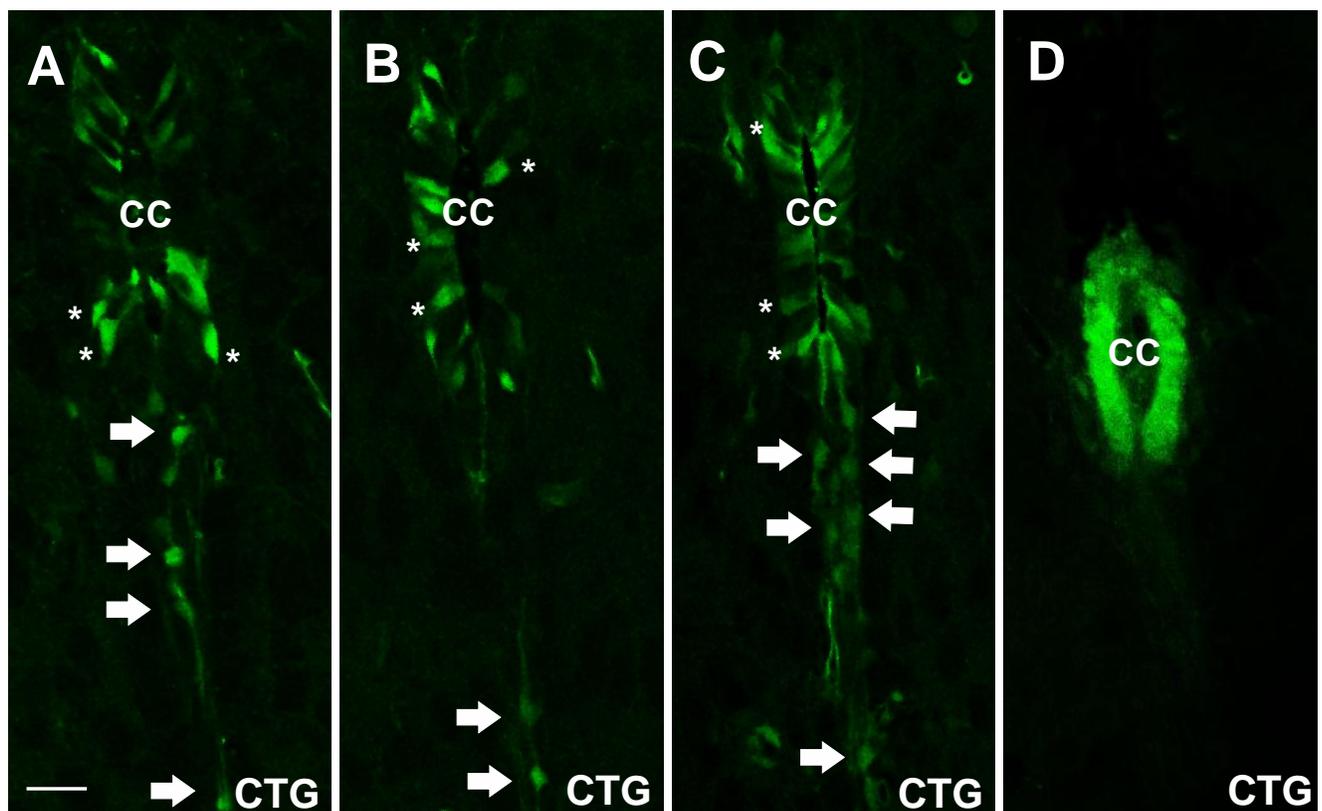
#### 4.3.2 Estudios con *Cell Tracker Green* sugieren que la lesión induce la migración celular a partir de la región endimaria

El *Cell Tracker Green* (CTG) es una sustancia fluorescente que es captada y retenida por cada célula individualmente y no es transferida a otras adyacentes (salvo por división). Las moléculas del colorante pasan a través de la membrana celular y una vez dentro del citoplasma pueden ser conservadas mediante el uso de fijadores aldehídos.

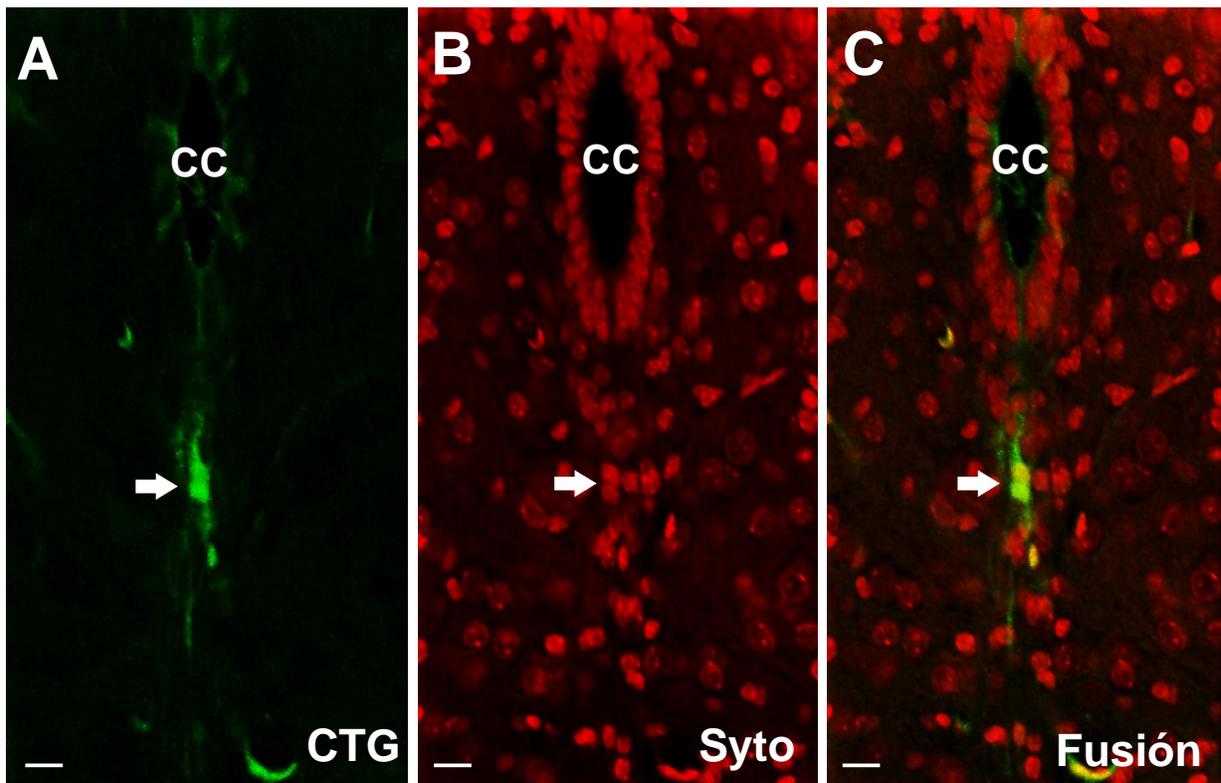
En nuestros experimentos (n=7), se inyectó CTG en la cisterna magna en el día P5 y ese mismo día se efectuó la lesión compresiva. Tres días más tarde los animales fueron sacrificados y analizados. Los controles sin lesionar (n=3) fueron realizados en la misma escala temporal, perteneciendo todos los animales a la misma camada y siendo todos ellos separados de la madre y alimentados manualmente.

Como se detalló anteriormente, la optimización del procedimiento de inyección fue clave para obtener resultados confiables. A pesar de algunas dificultades iniciales fue posible marcar selectivamente en los controles, células en contacto con el líquido cefalorraquídeo. En el caso de las ratas lesionadas, las células que captaron el fluoróforo no solo se encontraron tapizando el CC, sino también

dispersas a lo largo de la línea media (Fig. 19 A-D). Los cuerpos celulares se distribuyeron a diferentes niveles dorso-ventrales configurando filas estrechas en similares a las descritas por Meletis y cols. en ratones lesionados (*Meletis et al.*, 2008). Es probable que algunas de las células que integran estas filas hayan perdido su conexión inicial con el CC y representen elementos movilizados a causa de la lesión. Ocasionalmente hemos hallado pares de células alejados del canal configurando imágenes que sugieren divisiones recientes. Se trataría de clones generados a partir de células que migraron, ya que como se adelantó, el CTG sólo se transfiere de una célula a otra durante la mitosis (Fig. 20 A-C).



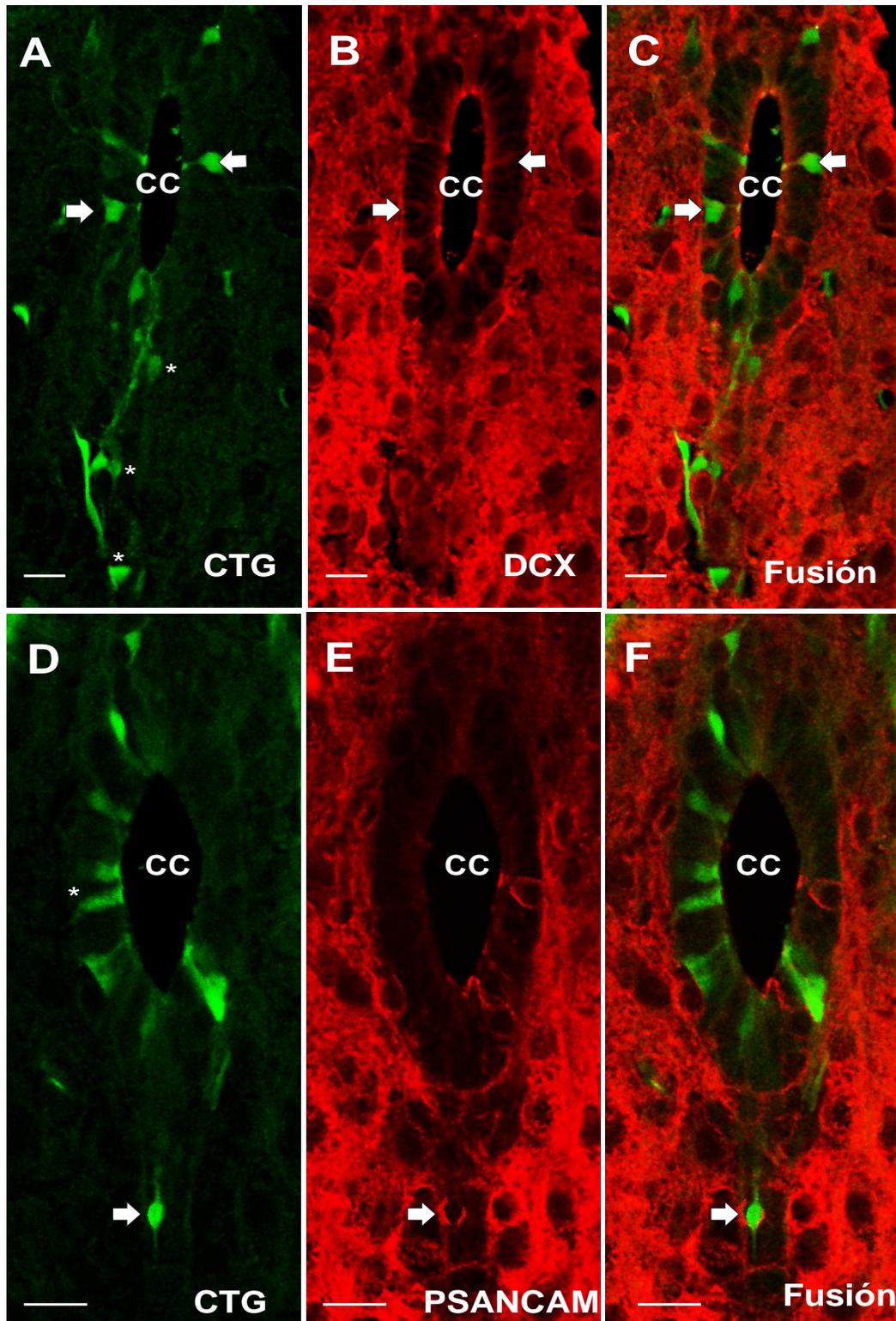
**Figura 19.** Se muestran tres ratas lesionadas (A, B y C) y su análogo en condiciones control (D). A este último se le inyectó una mayor cantidad de CTG para tener certeza de que no difunde libremente. Con flechas se indican las células que probablemente hayan migrado y con asteriscos las que permanecieron conectadas al CC. La barra de calibración corresponde a 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 20.** Células marcadas con Cell Tracker Green en la zona del rafe se encuentran alejadas del CC tres días luego de la lesión ( A, flecha). Sus núcleos aparecen apareados (B y C, flecha). Escala 20  $\mu$ m.

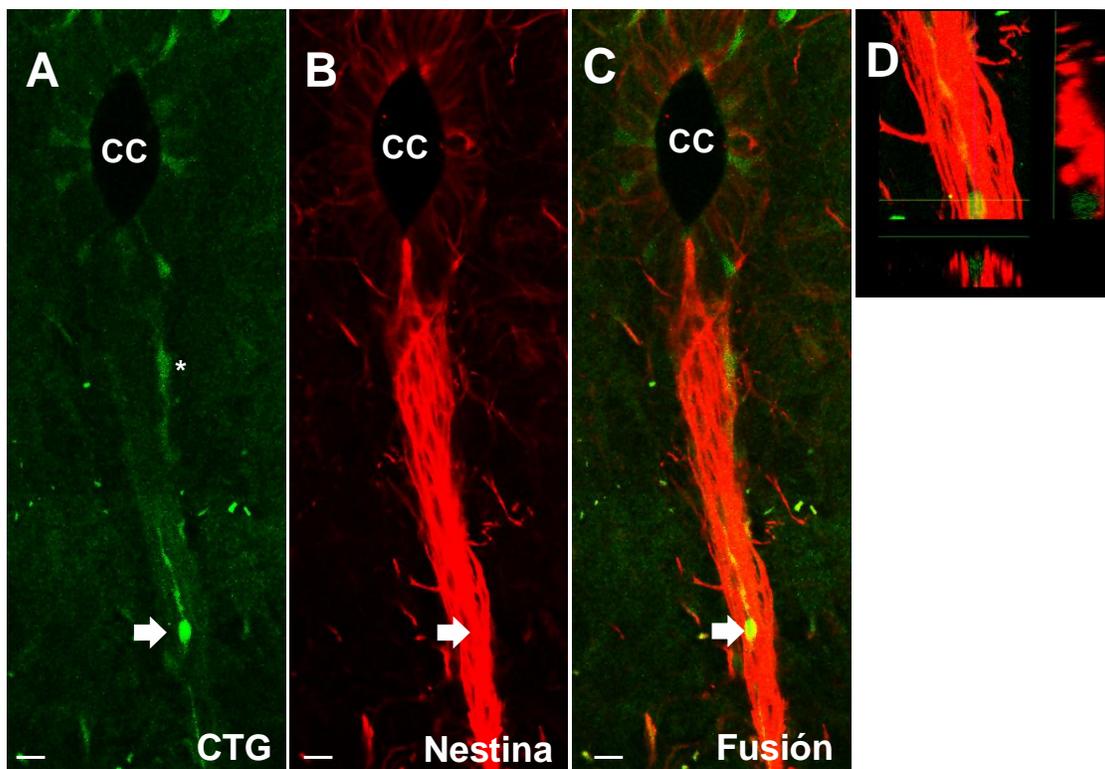
#### 4.3.3 Los fenotipos de las células potencialmente migrantes: todavía una incógnita.

Se ensayaron anticuerpos para detectar DCX y PSA-NCAM en las potenciales células migrantes. Los resultados revelaron que las células que captaron CTG y que además expresaban DCX, forman parte de la población celular que conserva su conexión con el CC (Fig. 21 A-C). En la población “desprendida” del CC y supuestamente movilizada, sólo hallamos células PSA-NCAM<sup>+</sup> (Fig. 21 D-F), hecho concordante con la hipótesis de que se trataría de células con potencialidades migratorias. Se debe indicar que ninguna de ellas expresó DCX.



**Figura 21.** Las células DCX<sup>+</sup> (A, B y C, flechas) marcadas con CTG se encontraron todas conectadas al CC. Las células alejadas del lumen fueron DCX<sup>-</sup> (A, asteriscos). Se encontraron en cambio células que captaron CTG, alejadas del CC y que fueron PSA-NCAM<sup>+</sup> (D, E y F, flecha) y células conectadas al CC PSA-NCAM<sup>-</sup> (D, asterisco). Escala 20  $\mu$ m.

La presencia de estas células teñidas por el CTG en la línea media nos hizo pensar, teniendo en cuenta la ubicación, que podrían expresar nestina (particularmente abundante en esa zona). Sin embargo los inmunomarcados con el anticuerpo correspondiente, dieron resultados negativos. Las células que incorporaron CTG se encontraron inmersas en un denso entramado de fibras nestina<sup>+</sup> (Fig. 22 A-D) pero no expresaron dicha proteína. Resultados negativos similares se obtuvieron con 3CB2 y vimentina.



**Figura 22.** Las células marcadas con CTG y alejadas del CC se encontraron en la parte ventral de la línea media (A, flecha), pese a estar en una zona rica en nestina (B, flecha), las mismas fueron nestina- (C, flecha) como se observa en los planos ortogonales (D). Escala 20  $\mu$ m.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 La GC de la rata neonatal es un nicho celular con propiedades plásticas

En el primer grupo de resultados se muestra que la GC es una zona de gran heterogeneidad celular con oligodendrocitos maduros y sus precursores, astrocitos, glías radiales, células madre neurales y neuronas de variadas características.

La GC contiene células progenitoras con capacidad proliferativa que expresan marcadores de células madre neurales y factores de transcripción propios del tubo neural del cual proviene. Estos datos están de acuerdo con los fenómenos plásticos desencadenados por la agresión mecánica.

En las tortugas, algunas células que contactan el CC poseen el fenotipo electrofisiológico y molecular de neuronas inmaduras, que en este animal están inmersas en un nicho de precursores neurogénicos (Russo et al., 2004; Russo et al., 2008). De manera análoga, existe en la rata neonatal, una subpoblación de células, en contacto con la luz del CC, que expresan el marcador neuronal temprano HuC/D y no el de neuronas maduras NeuN. Estas células que contactan el CC exhibieron propiedades moleculares y funcionales de neuronas en vías de diferenciación tal cual ha sido descrito en los nichos neurogénicos clásicos de los animales adultos (Lledo et al., 2006). Datos incluidos en esta tesis concuerdan con estudios previos que muestran que algunas células que contactan el CC en la rata adulta expresan PSA-NCAM, hecho compatible con su posible identificación con progenitores neuronales (Alonso, 1999). De hecho, la mayoría de las células HuC/D expresaron PSA-NCAM y DCX, moléculas que están presentes temporalmente en los neuroblastos en el embrión y en los nichos neurogénicos del cerebro adulto (Seki, 2002; Brown et al., 2003). Dado que las proteínas PSA-NCAM y DCX están involucradas en la migración celular, el crecimiento de neuritas y la regeneración (Couillard-Despres et al., 2005; Bonfanti, 2006) es razonable pensar que la GC en animales neonatales podría mantener un grado de plasticidad similar al de los nichos neurogénicos (Ming & Song, 2005).

La similitud de los fenotipos de las neuronas que contactan el CC, con los de algunas células de estos nichos, nos indujo a plantear la hipótesis de que estas

neuronas pudieran generarse luego del nacimiento. Hay que señalar en este contexto, que Shechter y cols. (2007) describieron la generación de nuevas células DCX<sup>+</sup> en la médula espinal de la rata a partir de la estimulación periférica. Sin embargo, nuestros experimentos que involucraron tanto la inyección de BrdU en ratas neonatales como en animales gestantes, demostraron de manera inequívoca, que las neuronas que contactan la luz del canal se originan durante el período de vida intrauterino. Estos hallazgos concuerdan con los de Alonso (1999) y Stoeckel y cols. (2003) quienes no constataron la incorporación de BrdU en células PSA-NCAM<sup>+</sup> de roedores adultos.

De acuerdo a nuestros datos, estas peculiares neuronas, mantienen una vez finalizada la vida embrionaria, características de inmadurez funcional y molecular operando tal vez, como un reservorio disponible en caso de lesión. Cuando las circunstancias lo ameritan, podrían completar la diferenciación y migrar para integrarse a los circuitos neuronales preexistentes. Es también posible considerar como hipótesis alternativa, que se trate de una población particular de células nerviosas con características funcionales y moleculares propias, que cumple roles en la detección de potenciales alteraciones en la composición del líquido cefalorraquídeo y su homeostasis. Son concordantes con este posible rol funcional, los hallazgos de Huang y cols. (2006), quienes señalan que en ratones, las neuronas que contactan el CC son fuertemente excitadas por variaciones del pH en el líquido cefalorraquídeo (Huang et al., 2006).

## **5.2 Cambios fenotípicos inducidos por la compresión**

La lesión por compresión además de provocar la dilatación del CC, generó engrosamientos en las terminaciones de los axones cortados y aumento de proliferación, acompañado de un sesgo en la naturaleza de las células proliferantes.

Ramón y Cajal utilizó diferentes términos para describir los engrosamientos axónicos (“masas terminales”, “masas de retracción” o “bolas de terminación o retracción”) sugiriendo que estas terminaciones engrosadas eran un reflejo de la irreversibilidad del daño. Sin embargo, investigaciones más recientes revelaron que

algunas de estas masas terminales mantienen capacidad de rebrote (Li & Raisman, 1995; Houle & Yin, 2001). La persistencia de estas estructuras podría indicar que fenómenos plásticos en la membrana y/o el citoesqueleto mantendrían la viabilidad axonal (Silver & Miller, 2004).

En relación al sesgo en las proporciones de células proliferantes, se ha de mencionar en primer lugar, que se duplicó el número de astrocitos que incorporaron BrdU. Este hecho era previsible y vinculable a la reacción astrocitaria característica de las injurias al SNC. Esto concuerda con observaciones realizadas en ratas adultas, las que dos semanas luego de una lesión espinal, duplicaron el número de astrocitos neoformados (Barnabé-Heider et al., 2010). También constatamos un aumento significativo en las células NG2<sup>+</sup> y BLBP<sup>+</sup> neoformadas. Sin embargo, la población de células PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> proliferante no mostró una variación significativa.

Si bien los antígenos NG2 y PDGFR $\alpha$  se consideran marcadores de células precursoras de oligodendrocitos (Wilson et al., 2006), las células NG2<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> luego de la lesión fueron más abundantes que las PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>. Esto induce a pensar que existen dos sub-poblaciones diferentes de precursores de oligodendrocitos. Es importante mencionar que algunos autores sostienen que luego de una lesión el NG2 también se expresa, en macrófagos, alcanzando el pico máximo de expresión a los siete días post-injuria (Jones et al., 2002). Por lo tanto no es posible descartar que esta diferencia se deba, al menos en parte, al aumento de células NG2<sup>+</sup> extraneurales de naturaleza hemocitopoyética. La población NG2<sup>+</sup> que incorporó BrdU podría incluir además, polidendrocitos neoformados, células que se cree son pluripotentes y que pueden originar oligodendrocitos, astrocitos o incluso neuronas (Nishiyama et al., 2009). La verificación de alguna de estas hipótesis hace mandatorio un estudio más detallado, que involucre la utilización de vectores virales con el promotor para NG2. He de señalar finalmente, que la identificación de los progenitores de oligodendrocitos como el tipo celular con mayor capacidad proliferativa, tanto en condiciones control como post-lesión, no es llamativo, si se tiene en cuenta la temprana edad de los animales utilizados en este estudio.

Aparece como particularmente relevante el aumento de las células BLBP<sup>+</sup> luego de la lesión, dado que esta proteína es una de las que identifica a las llamadas glías

radiales. Estas células son vistas hoy como potenciales generadoras de variados linajes de células neuronales y gliales (Kriegstein & Álvarez-Buylla, 2009; Feng et al., 1994).

Como aspecto cualitativo sobresaliente se destacó la incorporación de BrdU por las células DCX<sup>+</sup>, ya que como se mostró anteriormente, en condiciones control, las mismas no incorporan esta sustancia luego del nacimiento. Si bien no se trató de un evento muy frecuente (n=10) esto sugiere que la compresión podría reactivar el ciclo celular de estas células neurales quiescentes que se encuentran en la zona endimaria. Alternativamente, los progenitores en el epéndimo podrían reaccionar generando células que en estas condiciones se diferenciarían hacia el linaje neuronal.

Las células DCX<sup>+</sup>/NG2<sup>+</sup> en el neocórtex de la rata adulta son consideradas un tipo de precursor multipotente que podría originar oligodendrocitos o neuronas (Tamura et al., 2007). Dado que las células NG2<sup>+</sup>, no se encontraron en la zona endimaria, y que la mayoría de las células DCX<sup>+</sup> que incorporaron BrdU sí se encontraron allí, creemos que éstas últimas no son DCX<sup>+</sup>/NG2<sup>+</sup>. Por los antecedentes mostrados anteriormente, consideramos que se trataría de las neuronas inmaduras que expresan además HuC/D y PSA-NCAM y que se encuentran aún en vías de diferenciación.

### **5.3 ¿Induce el daño espinal la migración de las células endimarias?**

Algunos autores han descrito que las células endimarias proliferan y migran hacia el sitio de la lesión en respuesta a una mínima lesión espinal (Mothe & Tator, 2005; Meletis et al., 2008). Además, en un modelo experimental de esclerosis múltiple se mostró que algunas de las células migrantes eran neuronas (Danilov et al., 2006). Estos hallazgos inducen a especular que el epéndimo de la médula espinal de la rata incluye un reservorio de neuronas inmaduras.

En nuestros experimentos comprobamos que frente a la lesión por compresión, las células del CC reaccionan reactivando el ciclo de proliferación celular (incorporación de BrdU por parte de células DCX<sup>+</sup>) y/o posiblemente migrando. Las células potencialmente migrantes se hallaron siempre en la parte ventral de la línea

media. Esto difiere en algo con lo mostrado por Meletis y cols. en 2008, ya que ellos observaron migración no únicamente en la zona de la línea media, sino también en otras variadas direcciones hacia el lugar de la lesión. Esta diferencia podría deberse a que los ratones transgénicos Nestin-CreER y FoxJ1-CreER (modelo de Meletis et al., 2008) permiten identificar sub-poblaciones en las células endimarias que en nuestro modelo pudieron no ser marcadas por el CTG (cabe recordar que esta sustancia sólo es incorporada por células en contacto con el líquido cefalorraquídeo y que, salvo la morfología, no brinda ninguna pauta para la identificación). Los autores mencionados demostraron además, que las células endimarias originan oligodendrocitos y astrocitos, que fueron hallados incluso en la cicatriz glial. Por lo dificultoso del cuidado post-lesión de los animales, nosotros no exploramos tiempos mayores a tres días post-lesión, por lo que no fue posible distinguir una cicatriz glial madura.

Una de nuestras hipótesis iniciales que proponía a las células DCX<sup>+</sup> conectadas al CC, como potenciales migrantes frente a una lesión medular parece no ser cierta dado que las células DCX<sup>+</sup> que captaron CTG permanecieron conectadas al CC. Llamativamente, sí lo harían las células PSA-NCAM<sup>+</sup> que captaron CTG, ya que encontramos algunas de ellas alejadas del CC y sin conexión aparente al mismo. Como se detalló en el primer capítulo, no todas las células HuC/D<sup>+</sup> y DCX<sup>+</sup> expresan PSA-NCAM, así como tampoco todas las DCX<sup>+</sup> expresan HuC/D (ver figuras 5 y 6).

Por último, las células migrantes podrían ser progenitoras que se desplazaron sobre un riel de células nestina<sup>+</sup>. Estas últimas además de su posible rol de célula madre podrían cumplir la función de guía de células movilizadas por la agresión.

La naturaleza de las células que parecieron migrar es aún una incógnita y se hace imperiosa la necesidad de realizar estudios más minuciosos con otras técnicas complementarias.

## 5. PERSPECTIVAS

Las perspectivas que surgen de este trabajo de maestría son varias, y se relacionan con los dos tópicos principales abordados: a) lo que podríamos denominar “plasticidad endógena”, referida a la generación, diferenciación y destino natural de las células de la GC luego del nacimiento y b) la “plasticidad inducida por la lesión”, abarcando aquí el conjunto de fenómenos de reparación del daño tisular y la posible recuperación de las funciones alteradas o suprimidas por la lesión en animales neonatales.

Respecto al primer punto debemos señalar que surge la necesidad de caracterizar minuciosamente las células con morfología de glía radial y capacidad proliferativa que se encuentran en la zona del rafe (esto debería incluir tanto aspectos moleculares como electrofisiológicos). Para ello además de las técnicas utilizadas en este trabajo de maestría, se podría incursionar en el campo de la biología molecular y diseñar un vector lentiviral que exprese la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor de nestina.

Acerca de las neuronas inmaduras que contactan el CC, sería interesante explorar con detención la hipótesis de que se trataran de células sensoriales que responden a variaciones del pH o a algún otro tipo de señal generada o transmitida por el líquido cefalorraquídeo.

En relación al segundo punto, se hace necesario confirmar que efectivamente existe migración celular frente a la lesión. Una posibilidad es utilizar técnicas de cultivo organotípico que nos permitan evaluar el comportamiento *in vitro* de las células que captaron CTG. Esta aproximación técnica podría combinarse idealmente con visualización continua en lapsos temporales.

También surge la necesidad de realizar registros electrofisiológicos de las células migrantes a fin de dilucidar su fenotipo funcional. Al poder visualizarse las células que captaron CTG, se podrían registrar sin ambigüedades las células que estuvieron conectadas al CC en algún momento. Esto al ser combinado con el abordaje inmunocitoquímico aportaría una descripción molecular y funcional más completa de estas células.

Mediante la técnica de *single cell RT-PCR* se podría además detectar la expresión de DCX, PSA-NCAM, nestina u otro gen de interés en las células registradas (esta técnica de biología molecular la he estado ensayando para evaluar la presencia de canales de K<sup>+</sup>).

Por otra parte, si bien parece que las células migrantes son DCX-, es necesario terminar de confirmar este hecho. Para ello he diseñado un lentivirus que expresa la GFP bajo el promotor de DCX. En estos momentos estoy realizando experimentos piloto en los granos del cerebelo en cultivo y en ratas neonatales.

Se procurará además evaluar los cambios de expresión de algunos de los genes de interés (DCX, PSA-NCAM, nestina, etc.) mediante la técnica de Real-time PCR. En paralelo a la realización de este trabajo de maestría, me he capacitado en el uso de esta y otras técnicas de Biología Molecular. Para ello he utilizado otro modelo biológico bien estudiado por nuestro grupo (tortugas de la especie *Trachemys dorbignyi*) que ofrecen como particularidad interesante la reconexión y recuperación motora luego de la sección total de la médula. En estos momentos estamos en las etapas finales de elaboración de un trabajo que describe estos resultados y en el cual figuraré como primer autora.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso G. (1999) Neuronal progenitor-like cells expressing polysialylated neural cell adhesion molecule are present on the ventricular surface of the adult rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol* 414:149–166.

Alvarez-Buylla A., García-Verdugo J.M., Tramontin A.D. (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Rev. Neurosci* 2: 287-293.

Beattie M.S., Bresnahan J.C., Komon J., Tovar C.A., Van Meter M., Anderson D.K., Faden A.I., Hsu C.Y., Noble L.J., Salzman S., Young W. (1997) Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. *Exp Neurol* 148:453– 463.

Beattie M.S., Farooqui A.A., Bresnahan J.C. (2000) Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 17:915-925.

Bolton W.E., Freeman J.W., Mikulka W.R., Healy C.G., Schmittling R.J., Kenyon N.S. (1994) Expression of proliferation-associated antigens (PCNA, p120, p145) during the reentry of G0 cells into the cell cycle. *Cytometry* 17:66 –74.

Briscoe J., Sussel L., Serup P., Hartigan-O'Connor D., Jessell T.M., Rubenstein J.L., Ericson J. (1999) Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signaling Nature. 398 (6728):622-7.

Busch S.A., Silver J. (2007) The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.*17:120–127.

Carlén M., Meletis K., Göritz C., Darsalia V., Evergren E., Tanigaki K., Amendola M., Barnabé-Heider F., Yeung M.S., Naldini L., Honjo T., Kokaia Z., Shupliakov O., Cassidy R.M., Lindvall O., Frisén J. (2009) Forebrain ependymal cells are Notch-

dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci.* 12: 259–267.

Carleton A., Petrenau T., Lansford R., Alvarez-Buylla A., Lledo P-M. (2003) Becoming new neurons in the adult olfactory bulb. *Nature Neurosci.* 6: 507-518.

Chiasson B.J., Tropepe V., Morshead C.M., van der Kooy D. (1999) Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci* 19:4462– 4471.

Danilov A.I., Covacu R., Moe M.C., Langmoen I.A., Johansson C.B., Olsson T., Brundin L. (2006) Neurogenesis in the adult spinal cord in an experimental model of multiple sclerosis. *Eur J Neurosci* 23:394–400.

Dervan A.G., Roberts B.L. (2003) Reaction of spinal cord central canal cells to cord transection and their contribution to cord regeneration. *J Comp Neurol* 458:293–306.

Eriksson P., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Alborn A., Nordborg C., Peterson D., Gage F. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med* 4, 1313 - 1317

Faulkner J.R., Herrmann J.E., Woo M.J., Tansey K.E., Doan N.B., Sofroniew M.V. (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury, *J.Neurosci.* 24:2143–2155.

Fawcett J.W., Asher R.A. (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull.*, 49(6):377-91.

Feng L., Hatten ME., Heinz N., (1994) Brain lipid binding Protein (BLBP) : a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 12: 895-908

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

Friedman B., Hockfield S., Black J.A., Woodruff K.A. Waxman S.G. (1989) In situ demonstration of mature oligodendrocytes and their processes: An immunocytochemical study with a new monoclonal antibody, Rip. *Glia* 2, 380–390.

Graham V., Khudyakov J., Ellis P. and Pevny L. (2003) SOX 2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39, 749–765.

Hayes N.L., Nowakowski R.S. (2000) Exploiting the dynamics of S-phase tracers in developing brain: interkinetic nuclear migration for cells entering versus leaving the S-phase. *Dev. Neurosci.* 22:44–55

Hendzel M.J., Yi W., Mancini M.A., Van Hooser A., Ranalli, A., Brinkley B.R., Bazett-Jones D.P. and Allis C.D. (1997) Mitosis specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348-360

Horner P.H., Power A.E., Kempermann G., Kuhn G.H., Palmer T.D., Winkler J., Thal L.J., Gage F.H. (2000) Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* 20: 2218-2228.

Huang A.L., Chen X., Hoon M.A., Chandrashekar J., Guo W., Tränkner D., Ryba N.J., Zuker C.S. (2006) The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442:934 –938.

Johansson C.B., Momma S., Clarke D.L., Risling M., Lendahl U., Frisen J. (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25–34.

Jones L., Yamaguchi Y., Stallcup W., Tuszynski M. (2002) NG2 Is a Major Chondroitin Sulfate Proteoglycan Produced after Spinal Cord Injury and Is Expressed by Macrophages and Oligodendrocyte Progenitors *J Neurosci.* 22(7):2792–2803

Kriegstein A., Alvarez-Buylla A. (2009) The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells *Annu. Rev. Neurosci.* 32:149–84

Lendahl U., Zimmerman L., McKay R. (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60: 585–595.

Lenhossék M. (1895) *Der feinere bau des nervensystems*. Berlin, Fischer's and Buchhandlung.

Levitt P., Rakic P. (1980) Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J.Comp Neurology* 193: 815-840.

Lim DA, Huang YC, Alvarez-Buylla (2008) Adult subventricular zone and olfactory bulb neurogenesis. In: *Adult neurogenesis* (Gage FH, Kempermann G, Song H, eds), pp 175–206. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor.

Lois C., Alvarez-Buylla A. (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci* 1993 Mar 1;90 (5):2074-7.

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

Meletis K., Barnabé-Heider F., Carlén M., Evergren E., Tomilin N., Shupliakov O., Frisén J. (2008) Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol* 6:182.

Mothe A.J., Tator C.H. (2005) Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat. *Neuroscience* 131:177–187.

Nishiyama A., Komitova M., Suzuki R., Zhu X. (2009) Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nature reviews* 10 : 9-22.

Noctor S.C., Flint A.C., Weissman T.A., Wong W.S., Clinton B.K., Kriegstein A.R. (2002). Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci*. 22(8):3161-73.

Norenberg M.D., Smith J., Marcillo A. (2004) The pathology of human spinal cord injury: Defining the problems. *Journal of Neurotrauma*, 21:429-440.

Ohori Y., Yamamoto S., Nagao M., Sugimori M., Yamamoto N., Nakamura K., Nakafuku M. (2006) Growth factor treatment and genetic manipulation stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured adult spinal cord. *J Neurosci*, 26(46):11948 –1196

Prada F.A., Dorado M.E., Quesada A., Prada C., Schwartz U., de la Rosa E.J. (1995) Early expression of a novel radial glial antigen in the chick embryo. *Glia*, 15: 389-400.

Radojicic M., Nistor G., Keirstead H. (2007) Ascending central canal dilation and progressive ependymal disruption in a contusion model of rodent chronic spinal cord injury. *BMC Neurology*, 7:30 doi:10.1186/1471-2377-7-30

Ramón y Cajal S. (1909). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres*. (Vol 1) Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto Ramón y Cajal (reimpreso en 1952)

Ramón y Cajal S. (1913-1914). *Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso*. Moya Madrid.

Rossignol S., Schwab M., Schwartz M., Fehlings M. (2007) Spinal Cord Injury: Time to Move? *J Neurosci*. 27 (44):11782-11792

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

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

Sander M., Paydar S., Ericson J., Briscoe J., Berber E., German M., Jessell T., Rubenstein J. Ventral neural patterning by *Nkx* homeobox genes: *Nkx6.1* controls somatic motor neuron and ventral interneuron fates (2000) *Genes & Dev*. 14:2134-2139

Schwab M., Thoenen H. (1985) Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors. *J Neurosci.* 5(9):2415-23.

Schwob JE, Farber NB, Gottlieb DI. (1986) Neurons of the olfactory epithelium in adult rats contain vimentin. *J Neurosci.* 6(1):208-17.

Sekhon L.H., Fehlings M.G. (2001) Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine* 26:2–12.

Shechter R., Ziv Y., Schwartz M. (2007) New GABAergic interneurons supported by myelin-specific T cells are formed in intact adult spinal cord. *Stem Cells* 25:2277–2282.

Silver J., Miller J.H. (2004) Regeneration beyond the glial scar, *Nat.Rev.Neurosci.* 5: 146–156.

Spassky N., Merkle F.T., Flames N., Tramontin A.D., García-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. (2005) Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 25:10 –18.

Sofroniew M.V. (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation, *Trends Neurosci.*32: 638–647.

Stichel C.C., Muller H.W. (1998) The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier. *Cell Tissue Res.* 294:1–9.

Stoeckel M.E., Uhl-Bronner S., Hugel S., Veinante P., Klein M.J., Mutterer J., Freund-Mercier M.J., Schlichter R. (2003) Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the rat spinal cord, a gamma-aminobutyric acidergic system expressing the P2X2

subunit of purinergic receptors, PSA-NCAM, GAP-43 immunoreactivities: light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 457:159 –174.

Tamura Y., Kataoka Y., Cui Y., Takamori Y., Watanabe Y., Yamada H. (2007) Multi-directional differentiation of doublecortin- and NG2-immunopositive progenitor cells in the adult rat neocortex in vivo *European Journal of Neuroscience*, Vol. 25, pp. 3489–3498

Tator C.H. (1995) Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal-cord injury. *Brain Pathology*, 5:407-413.

Van Praag H., Schindler A.F., Christie B.R., Toni N., Palmer T.D., Gage F.H. (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415: 1030-1034.

Watanabe M, Hadzic T, Nishiyama A. Transient upregulation of Nkx2.2 expression in oligodendrocyte lineage cells during remyelination (2004) *Glia*. 46(3):311-22.

Wilson H.C., Scolding N.J., Raine C.S. (2006) Co-expression of PDGF alpha receptor and NG2 by oligodendrocyte precursors in human CNS and multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol*. 176 (1-2):162-73.