

Unos organelos pocos conocidos: los adiposomas.

Su estudio en el canal endimario normal y lesionado

Pedro Alvarez

Facultad de Ciencias, Universidad de la República Uruguay

Pedro Alvarez: pachped@gmail.com

Orientador: Omar Trujillo Cenoz

Coorientadora: Maria Ines Rehermann

[Palabras claves: Liposomas, cuerpos grasos, canal central], endimocito, lesión medular, regeneración medular]

Título breve: Adiposomas en endimocitos

Resumen

A lo largo de la médula espinal, en el centro de la comisura gris, se aloja el llamado canal central (CC), que contiene y conduce al líquido cefalorraquídeo. El CC de la médula espinal es además, un potencial nicho neurogénico, que se activa con las lesiones espinales. Sería la fuente de los oligodendrocitos mielinizantes presentes en la cicatriz glial. La población celular que compone el CC es heterogénea, pero está predominantemente compuesta por endimocitos y en menor medida por células gliales y neuronas.

Cabe destacar que estas células endimarias, son peculiarmente ricas en organelos grasos denominados adiposomas (ADs). La abundancia de estos organelos y sus variaciones luego de una lesión medular induce a vincular sus actividades con cambios en el metabolismo lipídico, desencadenados por el daño medular.

Con el propósito de profundizar sobre este punto, estudiamos inicialmente, la distribución de los ADs en las células del CC de ratones en condiciones normales. Estos estudios mostraron una distribución homogénea a lo largo de toda la médula. Sin embargo, cuando se produjo daño medular la concentración de los ADs se disparó a más del doble, alcanzando los valores máximos en las zonas próximas a la lesión. Se debe tener en cuenta que los datos incluidos en este estudio provienen de lesiones efectuadas siempre a un mismo nivel medular (tóraco lumbar T13) pero cuyos efectos se han explorado a lo largo de los segmentos espinales clásicos (cervical, torácico y lumbosacro). Cuando se analizó el segmento tóraco lumbar se excluyó del recuento a la zona alterada por la lesión, pero se incluyeron obviamente, tanto el nivel adyacente rostral como el caudal (englobados ambos como "adyacentes").

Además se constató, por medio de la microscopía electrónica de transmisión (MET), la variedad de formas y relaciones intracelulares de estos organelos. Los hallazgos inducen a pensar que los ADs participan activamente en los fenómenos regenerativos asociados con el metabolismo lipídico y probablemente con la remielinización.

Introducción

Cuando se estudia la organización histológica de la médula espinal (ME) surge la reconocida existencia de una cavidad denominada canal central (CC) que recorre el órgano en la mayor parte de su extensión. Al profundizar nuestro análisis, aparece como dato significativo, que la población celular que forma el CC es heterogénea (1). El tipo celular más abundante es

epitelioide, con número mínimo de cilios (entre 1 y 2 cilios) denominado genéricamente endimocito o célula endimaria (2). Se ha observado en roedores, que estas células expresan diversos marcadores (GFAP, nestina, vimentina y otros) (3). Las diferencias de las proteínas expresadas por las distintas células endimarias dependen de la ubicación en el CC. Estos hallazgos y datos funcionales derivados de registros intracelulares han permitido plantear diversas hipótesis referentes a sus potenciales roles en respuesta a lesiones traumáticas de la médula espinal. Los mecanismos que actúan en la restitución de los circuitos neuronales dañados son diversos y parecen estar mediados por factores tales como la sustitución de células perdidas por células nuevas, secreción de factores neurotróficos y el reclutamiento de oligodendrocitos que remielinizan los axones afectados por la lesión (4, 5).

Varios estudios señalan a las células endimarias como candidatas a participar en los procesos regenerativos que siguen a eventuales lesiones espinales (6). Evidencias moleculares recientes parecen estar en concordancia con esta hipótesis: el perfil de expresión génica de la población celular que compone el CC presenta un nivel alto de enriquecimiento en genes asociados a la división celular (7).

Cabe señalar que las células que tapizan el CC son también particularmente ricas en adiposomas (ADs), también conocidos como cuerpos grasos o “gotas lipídicas”. Los ADs son organelos con una estructura característica: están delimitados por una monocapa de fosfolípidos y un núcleo con diversos tipos de lípidos. Este núcleo hidrófobo contiene lípidos neutros, especialmente triacilgliceroles (TG) y ésteres varios. Los lípidos son sustancias cruciales para el funcionamiento del sistema nervioso (8) y constituyen la principal fuente de almacenamiento de energía. Ambos, los ésteres de TG y esteroides sirven como depósitos de componentes lipídicos de la membrana (9). La observación por microscopía fotónica y microscopía electrónica de transmisión (MET) muestran a los ADs como cuerpos de forma variable cuyos diámetros varían entre 0,1 a 5 μm . Existen sin embargo, células especiales -adipocitos- en las cuales los ADs pueden alcanzar más de 100 μm de diámetro (10). Es importante destacar que existe una estrecha asociación entre el retículo endoplasmático (RE) y los ADs. Se postula que el RE origina los ADs mediante un mecanismo denominado “budding” o brote (11). También el movimiento bidireccional de algunas proteínas entre los ADs y la membrana del RE sugiere una relación estructural (12,13,14). Dado que el RE se representa como un complejo sistema de membranas que se continúan con la envoltura nuclear, es esperable también que existan asociaciones entre ambos componentes.

Se ha propuesto que los ADs podrían modular directamente el metabolismo lipídico del núcleo. Además, estos organelos citoplasmáticos pueden retener factores de transcripción, enzimas y componentes de la cromatina como histonas, las cuales podrían ser transferidos directamente al núcleo (15), a través de los poros nucleares que median el contacto directo entre ambos componentes. Cabe señalar que la presencia de ADs no parece estar limitada al sistema nervioso de los mamíferos sino que también han sido hallados en reptiles (salamandras) (16).

Los ADs fueron reconocidos inicialmente como meros depósitos de lípidos, pasivos, sin una dinámica propia. Sin embargo, en los últimos años han sido incorporados al grupo de los “organelos celulares”. Los estudios en este campo son escasos y aún queda mucho por dilucidar en cuanto a las funciones que cumplen en la dinámica del tejido nervioso. Una primera aproximación al estudio de estos organelos permite plantear varias interrogantes que se refieren a la distribución de los mismos a lo largo de la médula y su potenciales variaciones inducidas por la injuria.

En este trabajo se han utilizado técnicas histoquímicas y de análisis ultraestructural para responder a varias preguntas que consideramos importantes. En estos intentos se experimentó con cepas de ratones de laboratorio (*Mus musculus*). Nuestros esfuerzos se centraron en obtener información sobre la distribución de los ADs cubriendo todos los segmentos del canal endimario. Los datos así obtenidos sirvieron de base para estimar las modificaciones que se

podrían ocasionar en el número y distribución de los ADs como consecuencia de lesiones mecánicas de la médula, cuyos efectos se extienden a partir del lugar de la lesión a segmentos más alejados

Dos de nuestras aproximaciones experimentales evaluaron la potencial existencia de heterogeneidades en la concentración de ADs a lo largo y a lo ancho de la médula. En otras investigaciones complementarias, se intentó descubrir posibles vínculos entre la edad del animal y la población de ADs (datos no incluidos en esta tesis). Se estimó como un aspecto particularmente importante, la reacción de los ADs frente a la agresión mecánica de la médula, con especial atención a la proximidad o lejanía entre el canal epidural y el daño originado experimentalmente. El desarrollo de este proyecto implicó el trabajo con técnicas histológicas que permiten visualizar detalles de la organización de la médula espinal, particularmente de aquellos procedimientos que hacen visibles los ADs por medio de la microscopía fotónica y de sus detalles estructurales con microscopía electrónica. Se obtuvieron imágenes que mostraban diferentes aspectos de los ADs cuando son exploradas con técnicas de MET. Se seleccionaron aquellas que demostraban la frecuente asociación estructural de estos organelos con el núcleo celular.

Objetivos e hipótesis

El objetivo general de este trabajo es la caracterización de los ADs en el CC de ratones sanos y lesionados; desde su distribución en el eje rostrocaudal y anteroposterior, hasta aspectos ultraestructurales de su dinámica funcional. A continuación se plantean cuáles son los 4 objetivos específicos, estos se abordarán en el mismo orden, a modo de pregunta en la sección de resultados:

- Evaluar como es la distribución dorso-ventral de los ADs en la población celular que tapiza el CC

H1: Las regiones polares del CC presentan mayor concentración de ADs respecto a las laterales.

- Definir si a lo largo de la médula espinal hay diferencias en la concentración de ADs en las células que componen el CC en ratones sanos.

H2: La concentración de ADs es homogénea en sentido rostro-caudal en ratones sanos.

- Describir cómo varía la concentración y distribución de ADs luego de una lesión medular a lo largo del CC.

H3: Las lesiones medulares en ratones disparan un aumento significativo de la concentración de ADs en las células del CC.

- Estudiar los aspectos ultraestructurales de los ADs en las células del CC de los animales lesionados.

Materiales y métodos: visión general

Los estudios se llevaron a cabo en ratones adultos (*Mus musculus*) de 3 meses de edad. Una vez sacrificado el animal con las medidas éticas correspondientes, se procedió a la disección y extracción de la médula espinal, de la cual se obtuvieron las regiones cervical, torácica y lumbosacra. Con cada segmento de médula se realizó la inclusión para proceder a la obtención de cortes de 55µm en el vibratomo. Una vez montados los cortes, quedaron listos para observar y fotografiar. Ya fotografiado todo el material, se obtuvo el set de datos el cual fue analizado

con procedimientos estadísticos (Rstudio) para finalmente poder determinar cuáles regiones presentan diferencias en la distribución de ADs según el caso.

Animales

Los experimentos se realizaron en ratones adultos (P90-120) FoxJ1CreER-R26RtdTomato (donados por el Prof. Jonas Frisén, Karolinska Institutet) y ratones C57BL/6J (Jackson Laboratories). Los animales se mantuvieron en jaulas (330 x 20 cms con no más de 6 individuos en c/u) y se manipularon de acuerdo con las pautas del Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (protocolo # 006-5-2017: Temp. 21-22°C, humedad del aire entre 50-60%, ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h). Las jaulas se limpiaron dos veces por semana y se utilizaron cilindros de cartón para enriquecer el ámbito vital de los roedores .

Tabla 1. Síntesis de datos sobre ratones y procedimientos.

Referencia	Grupo	Sexo	Edad	Días post lesión
Fox 169	Control	Macho	3 meses	/
Fox 98	Control	Macho	3 meses	/
Fox 99	Control	Macho	3 meses	/
fox 63	Lesión	Macho	3 meses	15
fox 274	Lesión	Macho	3 meses	15
fox j 59	Lesión	Hembra	3 meses	30
fox j 60	Lesión	Macho	3 meses	30
fox j 61	Lesión	Hembra	3 meses	30

Lesión de la médula espinal

Los ratones fueron sedados con diazepam (5 mg/kg, i.p.) y anestesiados con ketamina (100 mg/kg, i.p.) y xilacina (10 mg/kg, i.p.). La lesión de la cara dorsal de la médula espinal se realizó según lo descrito por Frisén et al. (1993) (25). Posteriormente a la laminectomía, se procedió a seccionar transversalmente el cordón medular, a nivel torácico bajo (T 13) con un par de tijeras microquirúrgicas (profundidad 0.8mm) extendiendo el corte un segmento en sentido rostral. La recuperación de la anestesia se promovió con flumazenil (0,5 mg/kg, i.p.) y yohimbina (2 mg/kg, i.p.). Se administró clorhidrato de tramadol (3 mg/kg, ip) a las 0 y 24 hs post- cirugía para aliviar el dolor. Los ratones se fijaron a los 15 y 30 días después de la lesión espinal. Los animales en los que se realizaron todos los procedimientos quirúrgicos pero sin lesionar el cordón medular sirvieron como controles.

Microscopía fotónica

Tanto los animales control como los lesionados fueron anestesiados como se describió anteriormente y fijados por perfusión intracardiaca con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M (PB, pH 7,4). Luego se diseccionó la médula espinal y se obtuvieron los segmentos cervicales (C) ,torácicos (T) lumbosacros (LS) y adyacentes a la lesión (rostral y caudal) (Fig. 1a) los cuales se sumergieron por 12 hs en la solución fijadora.

Estos segmentos resultantes se cortaron en serie con un micrótopo vibratorio para producir secciones de 55µm de espesor, obteniendo 15 cortes por segmento. Posteriormente, dichos cortes fueron teñidos con Sudan Negro, una tinción característica para lípidos que permite

individualizar los ADs. El material fue montado en glicerol y estudiado con un microscopio fotónico (Axioskop de Zeiss) a diferentes aumentos (los detalles de la tinción, cuantificación y registro de las imágenes se encontrarán en la sección Anexos)

Microscopía electrónica de transmisión

Los animales fueron fijados por perfusión (mezcla dialdehídica), post fijados en una solución de OsO_4 e incluidos en resina epoxica. Luego de “curados” se obtuvieron cortes ultrafinos que fueron analizados en un microscopio JEOL.

Estadística

Para el análisis estadístico se usó Rstudio. Primero se evaluó que el set de datos cumpliera con las condiciones que habilitan a proceder con ANOVA (análisis de varianza para comparar múltiples medias), test principal en la estadística de este trabajo. Se puede asumir que la distribución de una muestra es normal mediante la valoración del p-valor del test Shapiro-Wilk. **Se suele establecer el valor de significancia $\alpha = 0.05$, así, para valores iguales o mayores a este, se define como distribución normal.** También el estadístico F nos permite definir si hay diferencia entre medias, valores de F iguales o cercanos a 1, indican que no hay diferencia entre las medias, valores mayores de F confirman esta diferencia. En aquellos análisis que presentaban más de dos medias, se evaluó como varían entre sí, con test HSD de Tukey. El criterio más usado es que **las diferencias entre dos medias es significativa, si valor $p < 0.5$.**

Resultados

Algunos de los resultados se presentan aquí como respuestas a interrogantes importantes para esclarecer la naturaleza y posibles funciones de los ADs. También se han incluido datos referentes a detalles ultraestructurales revelados por la MET.

1- ¿Existen diferencias en el número y distribución dorso-ventral de los ADs en la población celular que tapiza el CC?

Al observar un corte transversal de médula, se evidencian en el CC, regiones diferentes: unas que llamamos polares (dorsal y ventral) y otras que son laterales (izquierda y derecha) (Fig. 1a). Como ya se mencionó, la población celular del CC es heterogénea, con un tipo predominante que es el ependimocito. Esta variedad celular está acompañada por prolongaciones de células gliales (con somas fuera del CC) y una variedad particular de neuronas de tipo bipolar (en mucho menor número) conocidas como “contacting fluid cerebrospinal neurons” (CFCN) (3) que proyectan sus dendritas a la luz del canal.

El primer análisis cuantitativo se limitó a determinar si las regiones polares y laterales presentan diferencias significativas en cuanto a la concentración y distribución de los ADs.

Dado que el área de la región lateral es 3 veces mayor que el área de la región polar, se ponderó la concentración de ADs teniendo en cuenta el total del área de cada región. Usando ese procedimiento, no se observaron diferencias. Es decir, la distribución radial de ADs en el CC es homogénea (Fig. 1c). El área de los polos representa el 28% del total del canal (y de cada plano). Consecuentemente, el promedio de ADs asociados a células de esta región representa el 24% del total de ADs observados por planos. La misma lógica indica que el 72% de los ADs observados pertenecen a los polos laterales que ocupan un 76% del total del área del CC.

Con estos resultados rechazamos la H_1 , contrario a lo que creíamos inicialmente, la distribución dorso-ventral de ADs en el CC si es homogénea.

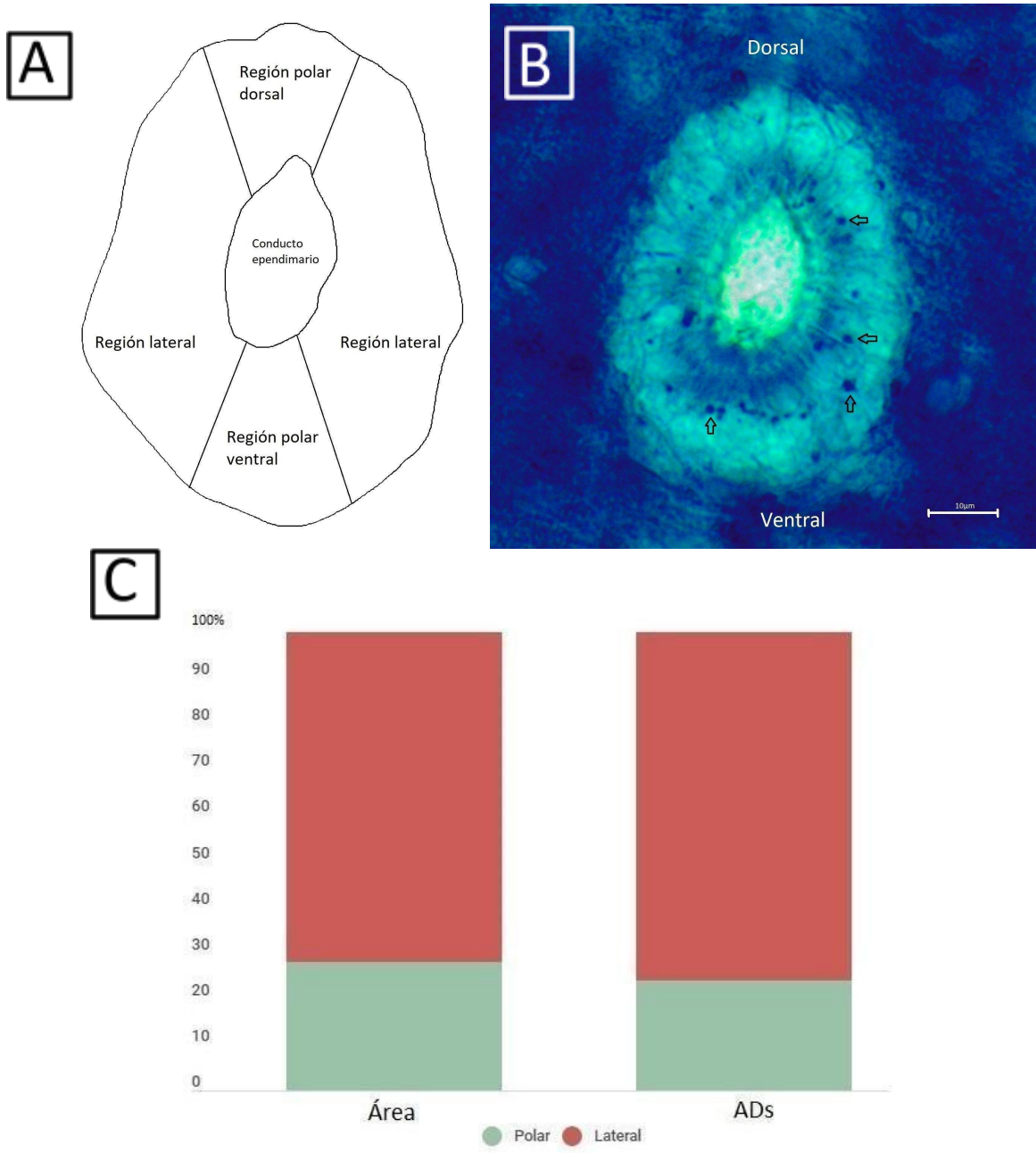


Figura 1.

- a) Esquema de un corte transversal del CC. Se indican las regiones laterales y polares según el criterio establecido para este trabajo.
- b) Micrografía fotónica del CC, tinción específica de lípidos (flechas en negro indican algunos ADs como ejemplo, Sudán Black). Barra de escala= 10 µm
- c) Gráfico de barras que representa la concentración de ADs y las áreas que ocupan de las regiones polares y laterales del CC (cervical, torácico y lumbosacro). Eje Y, porcentaje del total; eje X, área y ADs.

2- ¿Cómo es la concentración de los ADs en las células que tapizan el CC a lo largo del eje rostrocaudal de la médula espinal en condiciones normales?

Para responder a esta interrogante se procedió a cuantificar los ADs en segmentos rostro caudales del canal epidural de ratones (N=3). Tal cual lo muestran nuestros datos la concentración de ADs es similar en todas las regiones (Fig. 2):

Test de Tukey de 2 vías:

Cervical/Toracico: 0.8 p

Toracico/lumbo-sacro: 0.1 p

Lumbo-sacro/Cervical: 0.3 p

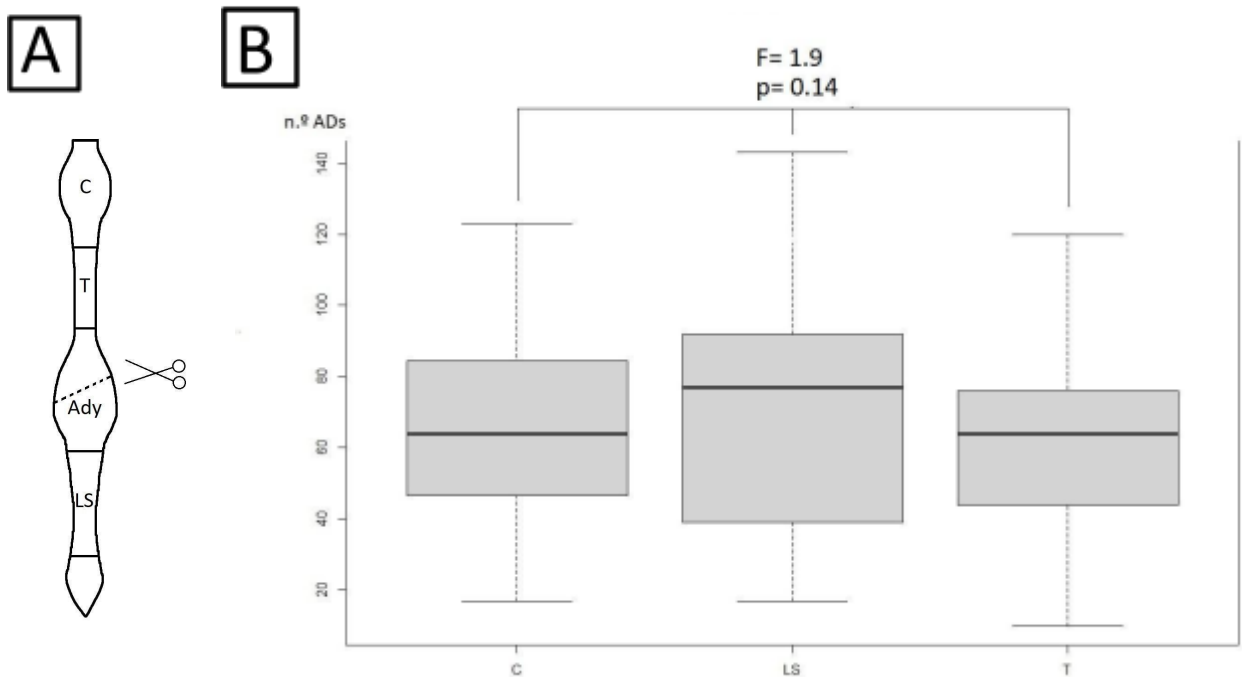


Figura 2.

- Esquema de la médula espinal de ratón y sus correspondientes regiones: Cervical; T: Torácico; Ady: Adyacente próximas al sitio de la injuria; LS: Lumbosacro. La línea punteada corresponde al sitio de la lesión.
- Distribución y concentración de ADs a lo largo de la médula de ratones controles. Eje X: C,T y LS corresponden a las regiones de la médula. C: Cervical. T: torácica y LS: Lumbo-Sacro. Eje Y: Número de ADs.

Estos resultados son concordantes con la H2 planteada previamente, podemos concluir que la concentración de ADs es homogénea en sentido rostro-caudal en ratones sanos.

3 - La tercera incógnita tiene que ver con la constancia o variabilidad en el número de ADs. ¿Cómo varía la concentración y distribución de estos organelos luego de una lesión medular?

En estos experimentos se evaluó el número de ADs en distintos segmentos de médulas lesionadas (ver materiales y métodos). Las cuantificaciones se llevaron a cabo 15 y 30 días luego de las lesiones, comprobándose que el número de ADs aumentó significativamente en ambos ámbitos temporales (Fig. 3).

Los resultados obtenidos muestran que el número de ADs aumenta en la condición "lesionada" a casi el doble respecto al control (Fig. 3): Test Anova

Valor p: $2 \cdot 10^{-16}$ F: 105

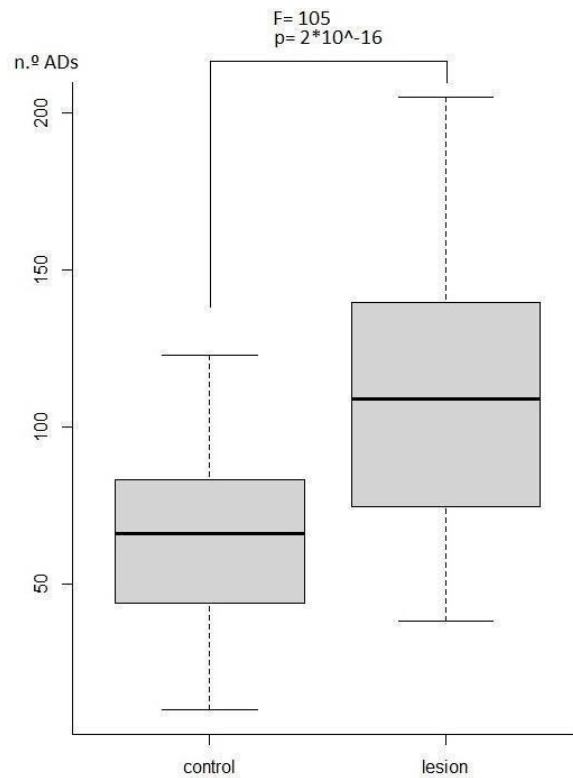


Figura 3. Concentración de ADs en las células del CC en condición de control y lesión. Eje y corresponde a la cantidad contada de ADs.

Estos resultados nos permiten validar la H3, parece que las lesiones medulares en ratones disparan un aumento significativo de la concentración de ADs en las células del CC.

Cuando analizamos por regiones medulares vemos, al igual que se había mencionado previamente, como en las regiones C, T y LS en la condición normal mantienen la misma concentración de ADs. Sin embargo, al lesionar la médula, las concentraciones de ADs a lo largo de la médula deja de ser homogénea, con un pico de concentración de ADs en las regiones adyacentes a la lesión (Fig. 4a). La misma figura ilustra cómo la lesión incrementa significativamente el número de ADs en esas tres mismas regiones, extendiendo además la “invasión” de ADs a lo que llamamos zonas adyacentes (áreas rostral y caudal respecto a la lesión).

Al comparar la cantidad de ADs en las regiones adyacentes a la lesión con las regiones equivalentes en el grupo control, las diferencias se acentúan aún más. El valor de ADs contados en los individuos normales fue de 64 (promedio) y 135 (promedio) para los individuos en condición de lesión (Fig. 4b).

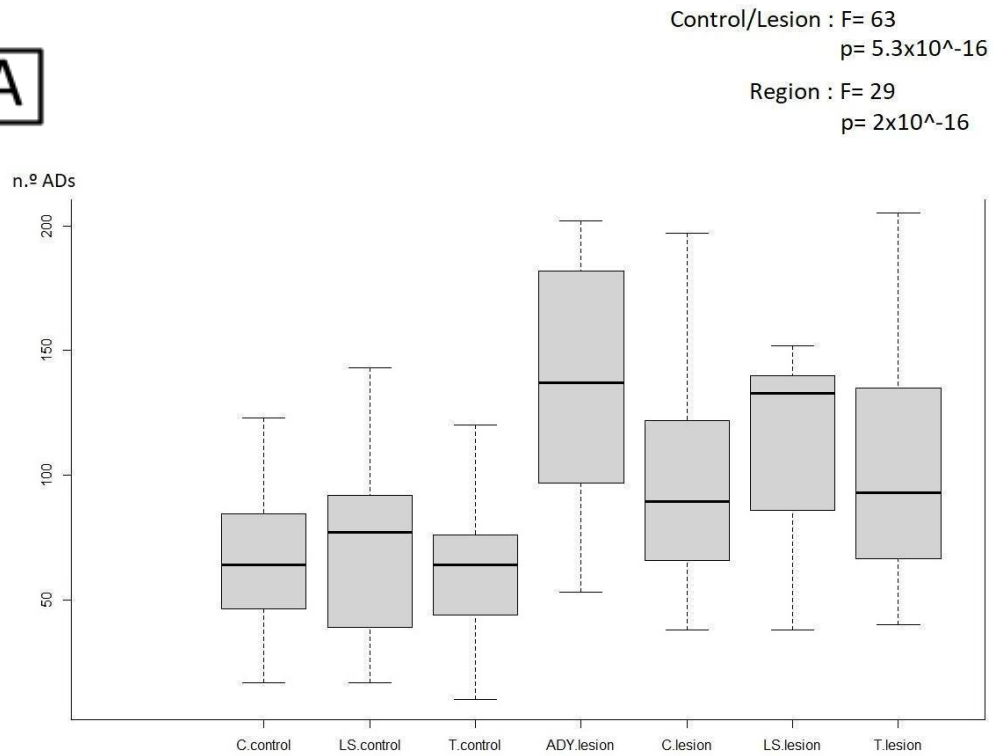
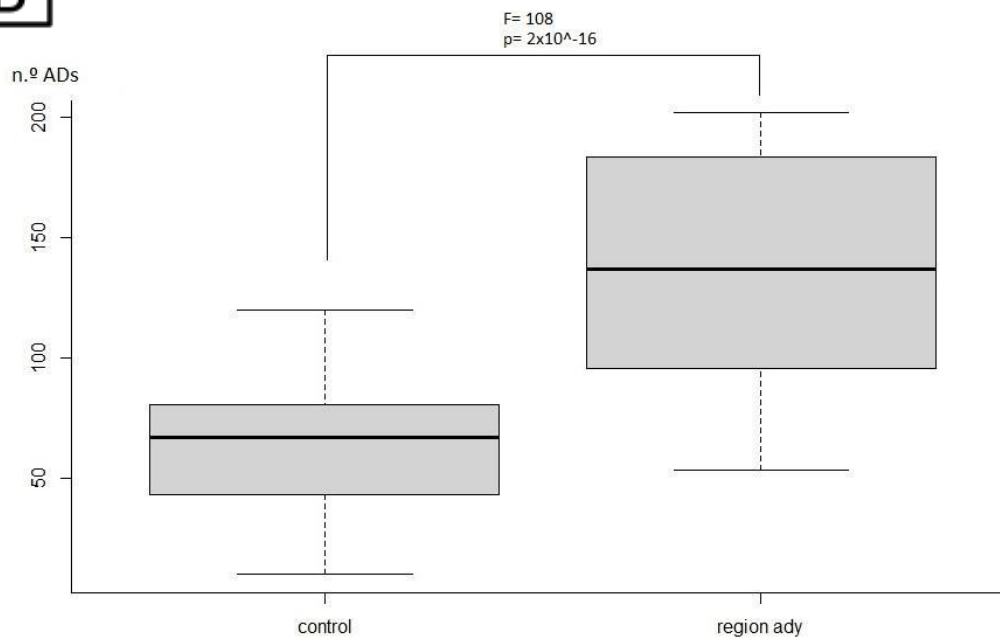
A**B**

Figura 4.

- Boxplots de cantidad de ADs en las diferentes regiones medulares C: cervical, T:Torácica, LS: lumbosacra y ADY: adyacente a la lesión, de 2 grupos de ratones: condición control (normal) y condición lesión.
- Comparación de la concentración media de ADs en la región adyacente a la lesión (vértebra T13) en condiciones de lesión y la región equivalente en la condición de control (normal).

4- ¿Cuáles son los aspectos ultraestructurales, referentes a ADs de las células que componen el CC en animales lesionados?

Tal como puede observarse en la Fig. 5 los ADs aparecen en los cortes ultrafinos como estructuras de densidad electrónica heterogénea. Hay grupos de ellos con zonas particularmente claras que aparentan haber perdido parte de sus componentes osmiofílicos (Fig. 5d). En otros casos se puede distinguir una capa relativamente delgada que podría considerarse una corteza (menos densa) compuesta por agregados moleculares diferentes a las que constituyen el centro de la partícula. Es común constatar en el seno de cada organelo áreas rectangulares que carecen totalmente de material opaco a los electrones. Nos pareció de particular interés la frecuente asociación entre algunos núcleos de las células dependientes y los ADs. En esos casos se observa una concavidad en la superficie nuclear que es ocupada por un AD. La observación a mayor aumento ha permitido identificar puentes de alta densidad electrónica que vincula ambos componentes celulares.

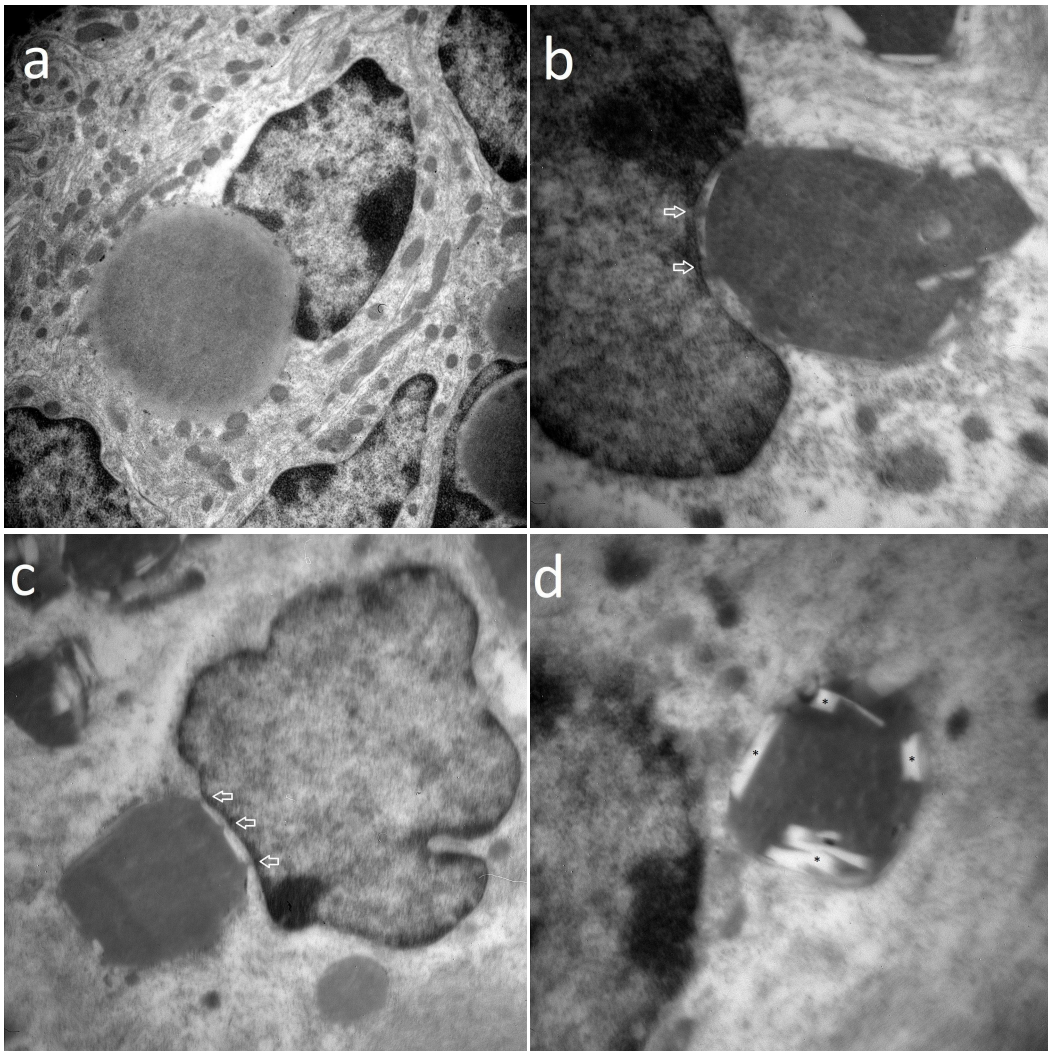


Figura 5. Imágenes de cortes ultrafinos obtenidas con un microscopio electrónico de transmisión. a-b- Es frecuente hallar ADs alojados parcialmente en nichos de los núcleos de endimocitos. En b se aprecia el contacto (flechas) que se establece entre el material electrón-denso presente en el núcleo y el que constituye el AD, estos “puentes” también se observan en C (flechas). Tal cual se observa en d existen ADs con zonas geométricas regulares (asteriscos), que parecen corresponder a conglomerados moleculares (tipo cristaloides) que se

han sublimado por la acción de la energía del haz de electrones, Aumentos: a= 14000x; b-d= 29000x; c= 19000x.

En algunas ocasiones se intentó transitar en un mismo tejido, desde las imágenes que proporciona la microscopía de luz hasta las que proporciona la MET. En estas circunstancias observamos zonas que contenían células endimarias reactivas, posiblemente movilizadas por la lesión que contenían grupos de ADs. Aparentemente, los ADs residentes en células reactivas próximas a la lesión mostraron contornos irregulares y la presencia de abundantes “zonas claras” (5d).

Discusión

Los resultados obtenidos en el curso de esta investigación demuestran cómo los ratones normales tienen ADs homogéneamente distribuidos en las células del CC a lo largo de la médula espinal, tanto en sentido dorso-ventral (Fig 1d) (contrario a lo planteado en la H1) como en sentido céfalo-caudal (Fig 2), confirmando lo mencionado en la H2. Sin embargo, no se trata de poblaciones estáticas sino dinámicas y reactivas ya que, en base a nuestros resultados, los ratones aumentan al doble la concentración de ADs en el CC en caso de ser objeto de lesiones espinales (Fig 3), acorde a la H3. Al producirse una lesión espinal la distribución de ADs en estas células se reconfigura, presentando los valores más altos en las regiones cercanas al lugar de la lesión (Fig 4b). Otro aspecto llamativo, es que evidenciamos como el patrón de distribución en las regiones C, T y LS (excluyendo ADY) en los ratones lesionados son iguales al mostrado en los casos controles (Figura 2b). Es decir, que al comparar estas tres regiones entre ambos grupos (control/lesión), la distribución es la misma, sin diferencias importantes entre las regiones pero con un aumento global del doble en el caso lesión respecto al control (Figura 6).

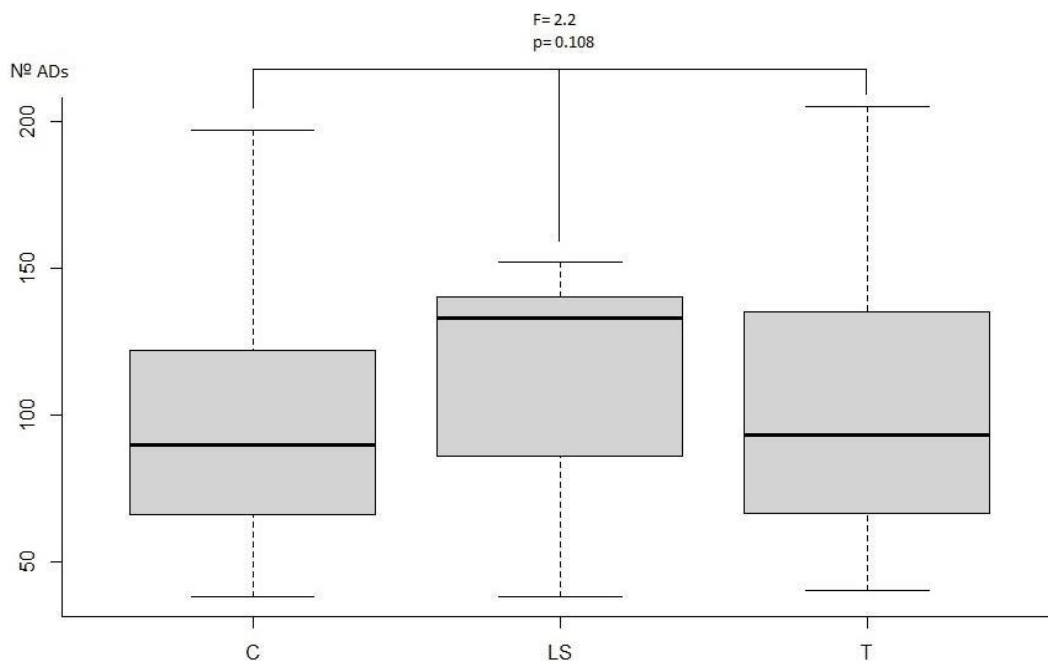


Figura 6. Boxplot de los números de ADs contabilizados en las regiones cervical, lumbosacra y torácica de ratones con lesión medular. Valores estadísticos del test de anova: F= 2.2 p= 0.108.

Este hecho hace pensar en la propagación de señales generadas en el lugar lesionado que se extienden a toda la médula modificando la concentración usual. Estos datos son coherentes con la información disponible que muestra al sistema nervioso central con una notable concentración de ADs (básicamente todas las células del cerebro han demostrado poder formar ADs (17). Sin embargo, permanecen inciertos los mecanismos que determinan el aumento y relocalización de estos organelos luego de una lesión espinal. Es altamente probable que estos cambios estén vinculados a mecanismos inflamatorios básicos también existentes en otros tipos celulares. Es así que estudios recientes han demostrado colocalización entre ADs y la proteína citosólica IBA1 (“ionized calcium-binding adapter molecule 1”) (18), la cual es expresada tanto en macrófagos como en microglías cuando dichas células son activadas por lesión (o asociadas a respuestas inflamatorias (19). Por otro lado, estos procesos de respuesta a la lesión, que se expresan como aumento en los ADs, podría reflejar una movilización de metabolitos lipídicos almacenados, (destinados a la recomposición de mielina o a otros componentes de las membranas celulares).

Otro rol conocido de los ADs, es la detoxificación celular. Al micro-compartimentar lípidos, los ADs actúan como “buffers”, protegiendo a las células de los efectos tóxicos de la excesiva abundancia de estas peculiares moléculas (lipotoxicidad) y al asociado estrés oxidativo (20). El mecanismo por el cual esto ocurre, es mediante la conversión de esteroides en ésteres de esteroides y su posterior almacenamiento en ADs. Estudios en macrófagos han demostrado como el exceso de lípidos conlleva a la apoptosis y muerte necrótica celular, fenómenos que exacerban aún más la lesión (21). Es también posible, que el aumento intracelular lipídico, pueda explicarse por alteraciones en el metabolismo, desencadenados por la lesión para evitar la muerte celular. Otra hipótesis plausible para explicar el llamativo aumento de los ADs sería su origen a partir de fragmentos de mielina que puedan haber quedado libres en el parénquima neural a consecuencia del daño tisular (22). Todas estas reacciones se engloban bajo el concepto de estrés celular, el cual es reconocido como el principal estímulo desencadenante del aumento de ADs, en células del SNC, como neuronas, astrocitos, microglía, oligodendrocitos y ependimocitos (23)

Perspectivas

Resulta obvio que sería beneficioso para consolidar nuestros hallazgos aumentar el número de animales de experimentación. Sin embargo, entendemos que el tamaño de la muestra es suficiente para estimar las tendencias en las distintas condiciones de control y lesión. Se ha comprobado que el número, tamaño y composición de los ADs puede variar mucho entre diferentes tipos de células (24) lo cual sugiere la existencia de paralelismos con otras funciones especializadas. Esta hipótesis es soportada por la variedad de imágenes mostradas por la MET. Para poder profundizar en estos temas, existen otras posibles técnicas a utilizar en futuras investigaciones. El rojo nilo, es una posible alternativa al sudan negro colorante utilizado en este proyecto. Sin embargo, ambos procedimientos tienen la desventaja de que tiñen lípidos en forma inespecífica. Otra técnica alternativa, asociada a la microscopía confocal y de fluorescencia, útil para la marcación específica de ADs es el BODIPY 500/510 (BODIPY), análogo fluorescente de ácidos grasos (empleable también para analizar fenómenos de migración y fases del ciclo celular). No caben dudas, que sería muy enriquecedor, conocer la composición lipídica y proteica de estos ADs, y así poder deducir en cuales procesos metabólicos podrían estar implicados. Un futuro estudio que implique el marcado molecular individual de componentes de los ADs en células ependimarias, posibilitaría descubrir el destino final que estas moléculas adoptan.

Se ha de proponer por último, que para estimar la importancia de los ADs en la regeneración, sería determinante inhibir el gen de la enzima acetyl-CoA carboxylase- α (ACCA) el cual

permite la síntesis y ensamblaje de los ADs (18). Consecuentemente habría que repetir en esos ratones genéticamente modificados las mismas estrategias experimentales (u análogas) que se describieron en esta tesina.

Anexos técnicos detallados

Técnica de Sudán Negro

Soluciones de propilene-glicol al 85%

Propilene-glicol puro 85.0ml

Agua destilada 15.0ml

Solución de Sudán Negro

Sudán negro 0.7g

Propilene-glicol 100.0ml

Preparación del Sudan Negro

1. Se disuelve 0.7 de sudan negro en 100 ml de propilene-glicol por calentamiento hasta 100°C.
2. Se agita por unos minutos solamente ,calentándolo a no más de 110°C.
3. Se filtra en papel filtro para eliminar el exceso de colorante.
4. Se deja enfriar a temperatura ambiente.

Obtención de los preparados para microscopía de luz

1. Se fija el material como se explicó anteriormente.
2. Se obtienen cortes con vibratomo de 55µm.
3. Se lavan los cortes con agua destilada.
4. Se sumergen los cortes por 3 min en Propilenglicol 100%.
5. Se incuvan por 5 mn en solución de Sudan negro.
6. Luego por 3 min en Propilenglicol 85%.
7. Posteriormente se realizan 3 lavados en agua destilada y se montan con glicerol para observarse al microscopio de luz.

Configuración del microscopio de luz

Las fotografías fueron tomadas con una cámara (modelo) integrada al microscopio mediante el software de cámaras digital "AmScope", con el siguiente set de aumentos: ocular 10x, objetivo 20x y zoom 1.6x. De cada corte de segmento de cada ratón se tomaron 3 fotos con diferentes planos focales.

Microscopía electrónica

Para estos estudios (micrografías analizadas n=20), los ratones fueron fijados por perfusión intracardiaca con una mezcla di-aldehídica que contenía 4% de paraformaldehído y 1% de glutaraldehído ambos disueltos en PB 0,1M(pH 7,4). Luego de diseccionar y extraer la médula espinal se obtuvieron segmentos de 1mm de espesor, se lavaron varias veces el PB y se post-

fijaron en tetróxido de osmio al 1% en PB. Los segmentos fueron deshidratados, embebidos en Durcupan ACM y curados a 60°C formando bloques adecuados para obtener cortes ultrafinos. Las zonas de interés se ubicaron en cortes semi-finos, teñidos con azul de metileno boracíc. Se realizó luego un “tallado” que limitó la zona de interés, haciéndola apta para conseguir cortes ultra finos seriados. Estos se montaron en “grillas de ranura (2x1mm)” recubiertas con polivinil-formvar. Se incrementó el contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. El material se examinó con un Microscopio electrónico Jeol CX 100 con una cámara digital 4000 AM DVC.

Análisis de los datos

En un total de ~ 600 fotografías, se procedió a contar manualmente la presencia de ADs con la herramienta Cell Counter del software de análisis de micrografías FIJI. Los conteos automáticos en base a redondez, color y tamaños promedios de los ADs fueron imprecisos por lo que se usó exclusivamente el conteo por selección visual -manual.

El criterio de selección para el conteo fue:

- a) cada ADs debe estar dentro de la membrana que limitan individualmente las células que componen el CC,
- b) el organelo debe estar en foco,
- c) la densidad de la tinción debe ser similar en todos los casos.

Para la parte de análisis de la distribución polar-lateral, el criterio se estableció en base a criterios histo-topológicos habituales. El área de la zona polar anterior y posterior fueron iguales entre sí, y de un total de 14% cada una respecto al área total del CC. Las áreas laterales izquierda y derecha fueron consideradas iguales entre sí, y de 36% cada una respecto al área total del CC (100%). Se usaron contadores diferentes con punteros de distintos colores según polar/lateral. Los valores polar anterior y posterior se sumaron entre sí y los lateral izquierdo con los lateral derecho.

Todos los valores de los conteos se pasaron a una planilla Excel, donde las columnas de izquierda a derecha fueron las siguientes:

Tabla 2: valores demostrativos a modo de ejemplo de la sección análisis de datos.

Grupo	Ratón	Segmento	Región	Polar/Lateral	Valor
Control	Ratón 1	No Ady	Cervical	Polar	18
Control	Ratón 1	No Ady	Torácica	Lateral	61
Lesión	Ratón 2	No Ady	Lumbo-Sacra	Polar	25
Lesión	Ratón 2	Adyacente	Adyacente	Lateral	87

Análisis estadístico

El análisis estadístico de este trabajo se hizo mediante Rstudio. Existen ciertas condiciones que se deben cumplir en el set de datos que habilitan a proceder con ANOVA, análisis de varianza para comparar múltiples medias:

- Las poblaciones deben ser independientes y las observaciones aleatorias, como este caso se trata de ratones diferentes donde aquellos individuos con lesión no afectan al conteo de aquellos control por ejemplo, esta condición se cumple a priori.
- El diseño debe ser equilibrado, si bien cada población no tiene exactamente los mismos datos, las diferencias son pocas y ambos N están en el mismo orden de magnitud.
- El tamaño total de la muestra de cada grupo debe ser menor al 10% de la población que lo representa, condición asegurada.

- Se puede aplicar aun cuando existe cierta falta de normalidad, para evaluar la distribución de las poblaciones, se procedió a la evaluación empírica de los histogramas y luego se sometió según el caso al test de Shapiro-Wilk (Figura 7).

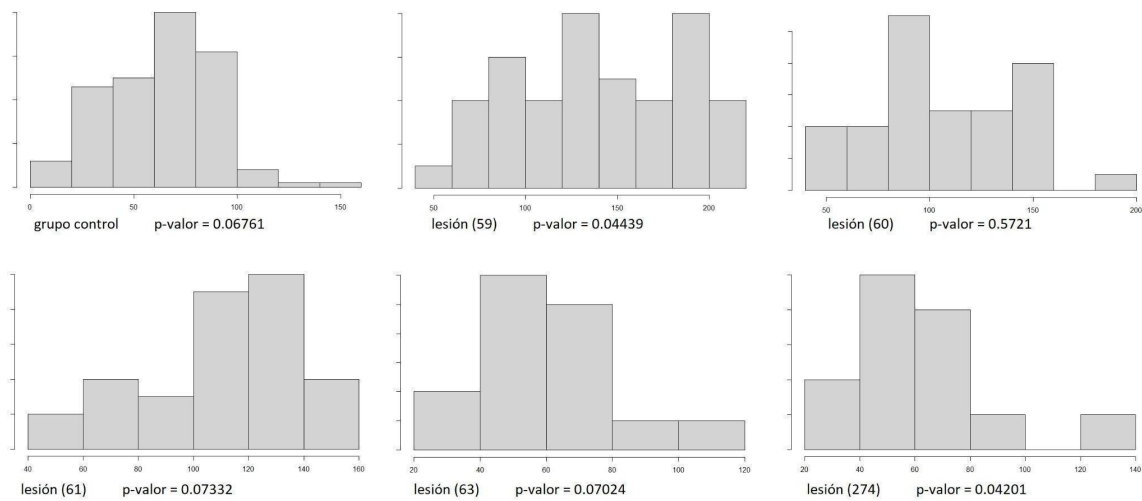


Figura 7. Histogramas de las distribuciones normales de las poblaciones de estudio y p-valor. arriba a la izquierda grupo control, los demás histogramas corresponden a cada individuo utilizado. El número entre paréntesis es la referencia del individuo.

Generalmente se puede asumir que la distribución de una muestra es normal mediante la valoración del p-valor del test Shapiro-Wilk. Se suele establecer el valor de significancia $\alpha = 0.05$, así, para valores iguales o mayores a este, se define como distribución normal. Evaluando los p-valor derivados del test de Shapiro-Wilk, se evidenció como el grupo control (N=3) presentó en su conjunto una distribución normal. El resto de los individuos se evaluó por separado y no como grupo lesión. Si bien la distribución de algunos individuos es levemente menor que α igualmente está dentro de los límites aceptables. Para determinar si existía diferencia de medias se hizo un test de varianza de las medias, ANOVA. De este test se evaluó el estadístico P y el F, este último se define como:

F = variación entre las medias de las muestras / variación dentro de las muestras

Este cociente entre dos varianzas refleja que tan dispersos están los datos con respecto a la media, por ende, cuando $F=1$ o F es cercano a 1, se acepta la hipótesis nula de que las medias son iguales, por el contrario si F un valor grande, entonces la variación dentro de las muestras es mucho menor a la variación entre las medias.

En aquellos análisis que presentaban más de dos medias, fue necesario hacer algún tipo de test post hoc, entonces se evaluó como varían entre sí, con test de carácter conservativo HSD de Tukey. El criterio más usado es que las diferencias entre dos medias es significativa, si valor $p < 0.5$, también Rstudio clasifica la significancia como "****" si p es muy cercano a 0, "***" si $0 > p < 0.001$ y "**" si $p > 0.005$

Resultados de los análisis estadísticos

Figura 2. Test Anova

F: 1.965

Valor P: 0.14

Test de

Tukey

Cervical/Torácico: 0.8 p

Torácico/lumbo-sacro: 0.1 p

Lumbo-sacro/Cervical: 0.3 p

Figura 3. Test

Anova F: 105

Valor p: 2×10^{-16}

Figura 4a.

Test de Anova de 2 vías (grupo y región)

Lesion/Control

F: 63

p: 5.3×10^{-14}

Regione

s F: 29

p: 2×10^{-16}

Test de Tukey

Cervical/Adyacente:

2×10^{-6}

Lumbo-sacro/Adyacente:

2×10^{-6} Torácico/Adyacente:

2×10^{-6} Lumbosacro/Cervical:

0.46

Torácico/Cervical: 0.36

Torácico/Lumbo-sacro: 0.03

Figura 4b. Test Anova

F: 108

p: 2×10^{-16}

Figura 6.

F= 2.2

p= 0.108

Bibliografía

- 1) Sabourin, J.C., Ackema, K.B., Ohayon, D., Guichet, P.O., Perrin, F.E., Garces, A., ... Kettenmann, H. (2009). A mesenchymal-like ZEB1+ niche harbors dorsal radial glial fibrillary acidic protein-positive stem cells in the spinal cord. *Stem Cells* 27, 2722–2733.
- 2) Edwards-Faret, G., Cebrián-Silla A., Méndez-Olivos, E., González-Pinto, K., García-Verdugo J.M., Larraín, J. (2018). Cellular composition and organization of the spinal cord central canal during metamorphosis of the frog *Xenopus laevis*, *The Journal of Comparative Neurology*.
- 3) Meletis, K., Barnabe´-Heider, F., Carle´n, M., Evergren, E., Tomilin, N. (2008) Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol* 6(7): e182.
- 4) Thuret, S., Moon, L.D., Gage, F.H. (2006). Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 7: 628–643.
- 5) Enzmann, G.U., Benton, R.L., Talbott, J.F., Cao, Q., Whittemore, S.R. (2006). Functional considerations of stem cell transplantation therapy for spinal cord repair. *J Neurotrauma* 23: 479–495.
- 6) Meletis, K., Barnabe´-Heider, F., Carle´n, M., Evergren, E., Tomilin N., Shupliakov, O., & Jonas Frisén, J. (2008). Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol* 6(7):e182.
- 7) Ghazale, H., Ripoll, C., Leventoux, N., Jacob, L., Azar, S., Mamaeva, D., ... Hugnot, J.-P. (2019) RNA Profiling of the Human and Mouse Spinal Cord Stem Cell Niches Reveals an Embryonic-like Regionalization with MSX1+ Roof-Plate-Derived Cells, *Stem Cell Reports*.
- 8) Gavgiotaki, E., Filippidis, G., Kalognomou, M., Tsouko, A.A., Skordos, I., Fotakis, C., & Athanassakis, I. (2015). Third harmonic generation microscopy as a reliable diagnostic tool for evaluating lipid body modification during cell activation: The example of BV-2 microglia cells. *J. Struct Biol.* 189, 105–113.
- 9) Bazinet, R.P., & Laye, S. (2014). Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 15,771–785
- 10) Walther, T. C., & Farese, R. V. (2009). The life of lipid droplets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6), 459–466
- 11) Pol, A., Gross, S.P & Parton, R.G. (2014) Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. *J Cell Biol* (2014) 204 (5): 635–646.
- 12) Murphy, D.J & Vance, J. (1999). Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci* 24: 109–115.
- 13) Turro, S., Ingelmo-Torres, M., Estanyol, J.M., Tebar, F., Fernandez, M.A., Albor, C.V., ... Pol, A. (2006). Identification and characterization of associated with lipid droplet protein 1: A novel membrane-associated protein that resides on hepatic lipid droplets. *Traffic* 7: 1254–1269.
- 14) Pol, A., Martin, S., Fernandez, M.A., Ingelmo-Torres, M., Ferguson, C., Enrich, C., & Parton, R.G. (2005). Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Mol Biol Cell* 16: 2091–2105

- 15) Zehmer, J.K., Bard, R., Bisel, B., Liu, P., Seemann, J., Anderson, R.G. (2009). Targeting sequences of ubxd8 and aam-b reveal that the er has a direct role in the emergence and regression of lipid droplets. *J Cell Sci* 122: 3694–3702
- 16) Wolfgang, A. (1970) Unusually Large Spherical Lipid Bodies in the Ependyma and Subependyma of the Salamander. *Z. Zellforsch.* 106, 523--538
- 17) Farmer BC, Walsh AE, Kluemper JC and Johnson LA (2020) Lipid Droplets in Neurodegenerative Disorders. *Front. Neurosci.* 14:742. doi: 10.3389/fnins.2020.00742
- 18) Farmer, B.C., Walsh, A.E., Kluemper, J.C., & Johnson, L.A. (2020). Lipid Droplets in Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 14.
- 19) Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Research. Molecular Brain Research.* 57 (1): 1–9.
- 20) Farese, R.V Jr. & Walther, T.C. (2009) Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T/j.cell.2009.11.005
- 21) Maxfield F.R., & Tabas, I. (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease maxfield. *Nature* 438, 612–621.
- 22) Lee, S.C., Moore, G.R., Golenwsky, G., & Raine, C.S. (1990). Multiple sclerosis: a role for astroglia in active demyelination suggested by class II MHC expression and ultrastructural study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 49, 122–136.
- 23) Ralhan, I, Chang, C.L & Schward, J.L (2021) Lipid droplets in the nervous system. *J. Cell Biol.* 2021 Vol. 220 No. 7 e202102136
- 24) Olzmann, J.A., & Carvalho, P. (2018). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.*
- 25) Frisén, J., Fried, K., Sjögren, A.M., Risling, M. (1993) Growth of ascending spinal axons in CNS scar tissue. *Int J Dev Neurosci* 4:461–475.