

INVESTIGACIÓN

2009

**INFLUENCIA DEL FLUIDO CEREBROESPINAL
EMBRIONARIO EN EL COMPORTAMIENTO DE
LAS CÉLULAS MADRE DEL CEREBRO ADULTO.
MODELO EXPERIMENTAL EN ROEDORES**

FUNDACIÓN MAPFRE

www.fundacionmapfre.com

Investigador Principal

M^a Isabel Alonso Revuelta

Dra. en Medicina y Cirugía.
Profesora Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid

Equipo Investigador

Ángel Gato Casado

Dr. en Medicina y Cirugía.
Profesor Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid

Aníbal de la Mano Bonín

Dr. en Medicina y Cirugía.
Profesor Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid

José Antonio Moro Balbas

Dr. en Medicina y Cirugía.
Profesor Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid

Índice

	Página
1. OBJETIVOS CONCRETOS	4
1.1. Objetivo principal	4
1.2. Objetivos específicos	4
2. PLAN DE TRABAJO	4
2.1. Primer semestre	4
2.2. Segundo semestre	4
3. INFORME PRIMER CUATRIMESTRE	4
(Demostración de la capacidad neurogénica del E-CSF sobre las células madre del cerebro embrionario en animales adultos)	4
3.1. Metodología empleada	4
3.1.1. Obtención de fluido cerebroespinal embrionario (E-CSF) de ratón	4
3.1.2. Cultivo <i>in vitro</i> de secciones de cerebro adulto de ratón	5
3.2. Resultados Obtenidos (Primer informe: 19-6-2010)	5
4. INFORME SEGUNDO CUATRIMESTRE	6
4.1. Resultados obtenidos	6
5. INFORME TERCER CUATRIMESTRE	7
5.1. Resultados obtenidos (tercer informe: 19-02-2011)	7
5.1.1. Valoración y cuantificación de los resultados obtenidos	7
1. Cultivo de hipocampo	7
2. Cultivo de zona subvetricular (zsv)	7
5.1.2. Expansión de la colonia de ratones transgénicos (ko para fgf2) y valoración de la influencia del e-csf sobre el comportamiento de las células madre del cerebro de roedor adulto	8
6. CONCLUSIONES	9

1. OBJETIVOS CONCRETOS

1.1. Objetivo principal

Demostrar la capacidad del Fluido Cerebroespinal Embrionario (E-CSF) para activar la neurogénesis a partir de células madre neurales en cerebro de ratón adulto y comprobar si dicha activación desencadena un proceso de neuroregeneración efectiva útil para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

1.2. Objetivos específicos

1. Estudiar la capacidad del E-CSF para estimular la actividad de las células madre neurales de roedores adultos promoviendo su supervivencia, replicación y la diferenciación hacia células de extirpe neural, cuantificando el efecto y comprobando el grado de maduración alcanzado.

2. Este estudio se realizara sobre cultivos organotípicos de secciones de cerebro de ratón adulto con implantes de microesferas impregnadas en E-CSF en hipocampo, zona subventricular y corteza, para comprobar si el efecto es extrapolable a células madre cuando están dentro del tejido nervioso adulto. Con valoración de la neurogénesis a corto, medio y largo plazo.

3. Consolidar un modelo experimental de déficit en la neurogénesis, basado en el empleo de ratones mutantes (con déficit de expresión de FGF2).

4. Estudiar si el E-CSF ejerce una acción neuroregenerativa en el modelo experimental descrito en el objetivo anterior. Valoración de los resultados como estrategia terapéutica en enfermedades neurodegenerativas.

cas del túnel son las siguientes: un primer tramo de longitud de penetración 2/3 de la longitud total y un diámetro de 8 mm y un segundo tramo de 1/3 de la longitud total y un diámetro de 4.5 mm.

2. PLAN DE TRABAJO

2.1. Primer semestre

Puesta en marcha de los estudios sobre células madre del SNC adulto en secciones histológicas (cultivo in vitro de secciones de cerebro adulto de ratón).

Inicio de condiciones experimentales.

Valoración de resultados, conteo y estadísticas.

2.2. Segundo semestre

Establecimiento de colonia de animales Knockout para el FGF-2. Expansión de colonias. Estudio de los parámetros de replicación y diferenciación de células madre en él y estandarización de niveles de expresión de presenilina y proteína amiloide.

Puesta en marcha de técnicas de cultivo en secciones histológicas del SNC de ratón Knockout. Estandarización de los mismos. Comienzo de condiciones experimentales. Valoración de los resultados y estadísticas.

Elaboración y publicación de los resultados obtenidos.

3. INFORME PIMER CUATRIMESTRE

El proyecto de investigación se está desarrollando con normalidad de acuerdo con lo previsto inicialmente, y los objetivos alcanzados hasta el momento han sido adecuados a la disponibilidad presupuestaria.

Con el desarrollo de este proyecto intentamos demostrar nuestro objetivo fundamental: la influencia de factores embrionarios sobre el comportamiento de las células madre del SNC adulto en roedores.

A continuación detallaremos los resultados más relevantes del proyecto.

Demostración de la capacidad neurogénica del E-CSF sobre las células madre del cerebro embrionario en animales adultos. En el primer cuatrimestre de desarrollo del proyecto hemos puesto en marcha una técnica de cultivo in vitro de secciones de cerebro de ratón adulto que nos permite tipificar la presencia de células madre en el hipocampo y en la zona subventricular. Estas células se caracterizan por ser las únicas capaces de dividirse y por tanto de incorporar BrdU y también de expresar marcadores de células indiferenciadas o de diferenciación neuronal temprana (Nestina, Doblecortina, PSA-NCAM, beta3-tubulina etc.).

3.1. Metodología empleada

3.1.1. Obtención de fluido cerebroespinal embrionario (E-CSF) de ratón

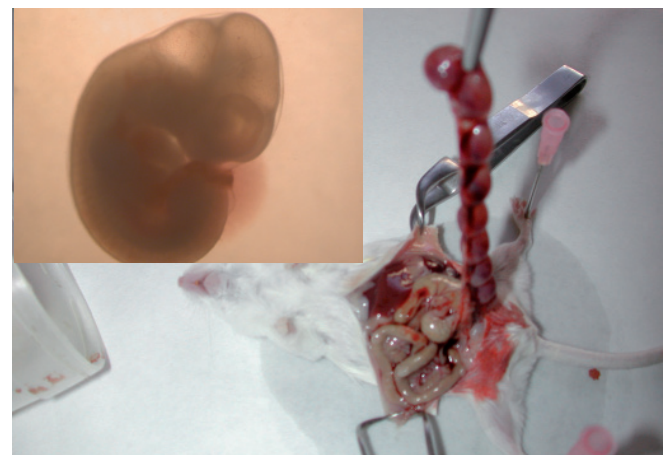


Figura 1. Extirpación del útero.

Para la obtención de fluido cerebroespinal (CSF) embrionario se procede al apareamiento de ratones de laboratorio y tras alcanzar los 13,5 días de desarrollo se procede a la extirpación del útero y sacrificio de las madres por dislocación cervical (bajo anestesia y aplicando los requisitos del manejo ético de animales de laboratorio). Los embriones se ex-

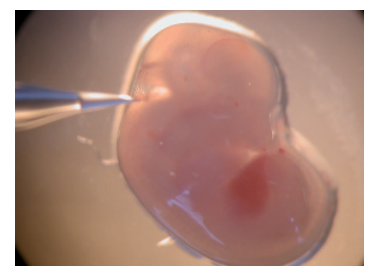
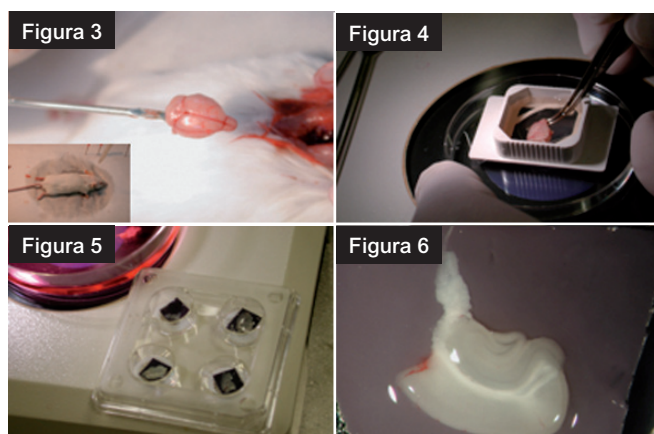


Figura 2. Extracción del embrión.

traen por técnicas de microdissección y en cada uno de ellos se inserta una microaguja de vidrio en el interior de la cavidad mesencefálica, conectada a un microaspirador y se obtiene el fluido contenido en el interior de la cavidad del cerebro embrionario. Esta operación se repite hasta obtener una cantidad apropiada de CSF, que será inmediatamente congelada y liofilizada para evitar su degradación proteica.

3.1.2. Cultivo *in vitro* de secciones de cerebro adulto de ratón

Al comienzo de este proyecto, hemos puesto en marcha la técnica de cultivo organotípico *in vitro* de secciones de tejido cerebral, que nos permitirá estudios a corto, medio y largo plazo, manteniendo la integridad y la estructura tisular. Básicamente, esta técnica consiste en la obtención del cerebro por disección en el animal tras ser decapitado (previa anestesia), aislamiento de las zonas seleccionadas (hipocampo y zona subventricular) e inclusión en agar para obtener secciones de 300 μm para su posterior cultivo. El cultivo se hace en medio Advanced DMEM suplementado con 1% Penicilina/Estreptomicina + 25% de Horse Serum + Glucosa 6 mgr/ml + 25% HBSS, con las secciones depositadas en papel de filtro (millipore) en pocillos individuales con 350 μl . de medio. Las placas de cultivo se incuban a 37°C con 5% de CO_2 . El medio de cultivo se renueva cada dos días. 24 Horas antes del final del cultivo se añade una solución de BrdU (100 μM) en el medio para su incorporación a las células que están en fase de replicación.



Figuras 3, 4, 5 y 6. Cultivo *in vitro* de cerebro adulto de ratón.

Con la técnica descrita hemos comenzado nuestro estudio realizando cultivos de secciones de hipocampo (CHR) y de zona subventricular (ZSV) “agudos”, de una semana de duración. Una vez estandarizada la técnica, en un segundo tiempo, hemos comenzado nuestro estudio experimental tratando de comprobar la influencia de factores embrionarios sobre el comportamiento de las células madre del SNC adulto en roedores. Para ello hemos cultivado muestras, a las que se añadía el CSF embrionario, obtenido por el método anteriormente descrito, mediante microimplante de microesferas de látex impregnadas en E-CSF, en las áreas de tejido nervioso que hemos descrito.

El procesamiento y valoración de estos cultivos se ha hecho de acuerdo a protocolos convencionales: Una vez fijadas y procesadas las muestras de acuerdo con los protocolos habituales, se obtuvieron secciones en cortes en parafina para la realización de técnicas inmunohistoquímicas que se realizarán según protocolos estándar:

- La **identificación de las células madre** se realiza por detección inmunohistoquímica de antígenos característicos de estas células como la Doublecortina, nestina etc.
- La **valoración de la replicación celular** en las secciones de las distintas condiciones experimentales se realiza por la detección inmunohistoquímica de BrdU.
- La **diferenciación neuronal** se valora mediante la detección de marcadores como la beta 3 tubulina o NeuN. Y la **diferenciación glial** se valora por la expresión de GFAP.

3.2. Resultados obtenidos

Con la metodología descrita se han obtenido muestras de secciones de hipocampo y de zona subventricular de cerebro de ratón adulto, tanto controles como experimentales (sometidos a la influencia de CSF embrionario de ratón).

Nuestro primer propósito fue localizar y tipificar las células madre en las secciones de ratón adulto, en el hipocampo y la zona subventricular, y posteriormente comprobar si aparecen cambios al someter a dichas células madre a la influencia de factores embrionarios mediante implante de microesferas impregnadas en CSF embrionario.

El análisis de nuestros resultados preliminares revela datos alentadores, ya que, como se puede ver en las imágenes adjuntas, en condiciones normales el número de células madre en el cerebro adulto es escaso y a juzgar por su capacidad de incorporar BrdU, su nivel de actividad mitótica es baja. Sin embargo, obsérvese cómo la presencia de E-CSF induce tanto un incremento de la replicación celular, como la aparición de un número elevado de células beta3-tubulina positivas (Tuj-1), con respecto a los controles.

En cuanto al estudio del proceso de diferenciación neuronal nuestros resultados revelan que se puede apreciar un incremento (aun no cuantificado) en el número de neuronas recién diferenciadas en los tratados con E-CSF con respecto a los controles.

Estos datos nos inducen a pensar que los estímulos provenientes del CSF embrionario son capaces de modificar el comportamiento de las células madre en el cerebro de roedores adultos favoreciendo la supervivencia de estas células, aumentando el índice replicativo de las mismas (por lo tanto expandiendo la masa crítica de células madre) y sobre todo activando el proceso de neurogénesis. En definitiva, esta influencia sería de gran utilidad en el desarrollo de estrategias terapéuticas de neuroregeneración y/o neuroprotección.

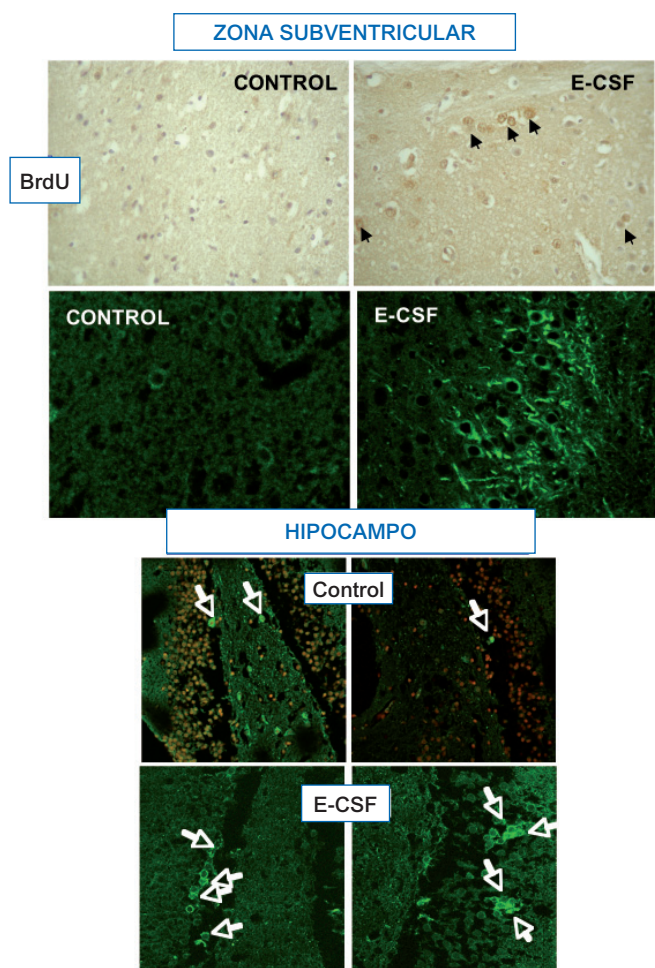


Figura 7. Zona subventricular.

4. INFORME SEGUNDO CUATRIMESTRE

El proyecto de investigación se está desarrollando con normalidad de acuerdo con lo previsto inicialmente, y los objetivos alcanzados hasta el momento han sido adecuados a la disponibilidad presupuestaria.

A continuación detallaremos los resultados más relevantes obtenidos durante el segundo cuatrimestre:

4.1. Resultados obtenidos

En este segundo cuatrimestre, empleando la metodología descrita en el primer informe (19-6-2010), hemos seguido avanzando en nuestro estudio tratando localizar y tipificar las células madre en las secciones de ratón adulto, en el hipocampo y la zona subventricular, estudiando los cambios que se producen en ellas al someterlas a la influencia de factores embrionarios mediante implante de microesferas impregnadas en CSF embrionario.

En nuestro estudio hemos empleado una batería de anticuerpos que nos ha permitido tipificar distintos tipos de células madre y la modificación de su evolución hacia neuronas.

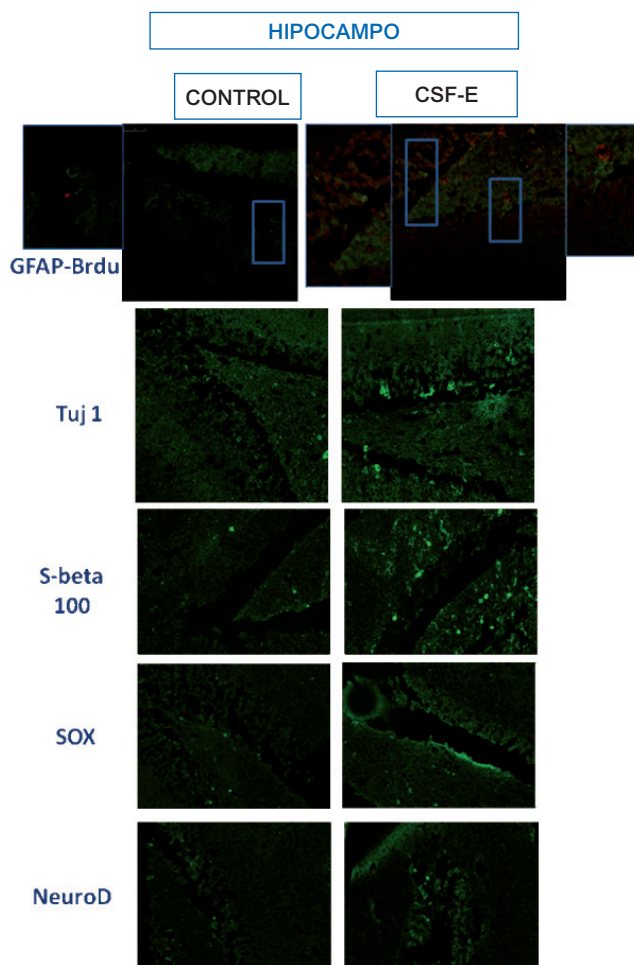


Figura 8. Hipocampo.

En primer lugar, hemos comprobado que el CSF embrionario en hipocampo y zona subventricular (ZSV) incrementa notablemente la presencia de células que coexpresan GFAP o S-100 (marcadores de astrocitos) y BrdU (marcador de replicación celular) indicando que el efecto inicial del CSF embrionario se realiza sobre astrocitos con capacidad de replicación, que son considerados como las auténticas células madre del cerebro adulto.

En segundo lugar, hemos comprobado el aumento generalizado de células BrdU positivas, tanto en la ZSV como en el hipocampo, expuestas a la acción del CSF embrionario, con respecto a los controles. Este dato indica que el CSF-E es capaz de inducir una respuesta mitogénica suficientemente amplia como para expandir significativamente la población de precursores neuronales, que en nuestra opinión es un paso imprescindible para generar una respuesta de neuroregeneración, útil como estrategia terapéutica.

En tercer lugar, el CSF embrionario es capaz de inducir en muchos de los precursores generados de novo un proceso de diferenciación neuronal temprano medido por el incremento de células Beta-3 Tubulina positivas.

Finalmente, como demuestra el inmunomarcaje con SOX y sobre todo con Neuro D (marcadores de neuronas maduras), el incremento en el número de células positivas se mantiene en los cultivos tratados con CSF embrionario con respecto a los controles, sugiriendo que muchas de las neuronas jóvenes (Beta-3 Tubulina positivas) inducidas por el

CSF-E a partir de células madre, alcanzan un grado de maduración notable, por lo que podrían llegar a transformarse en neuronas adultas integradas en circuitos funcionales.

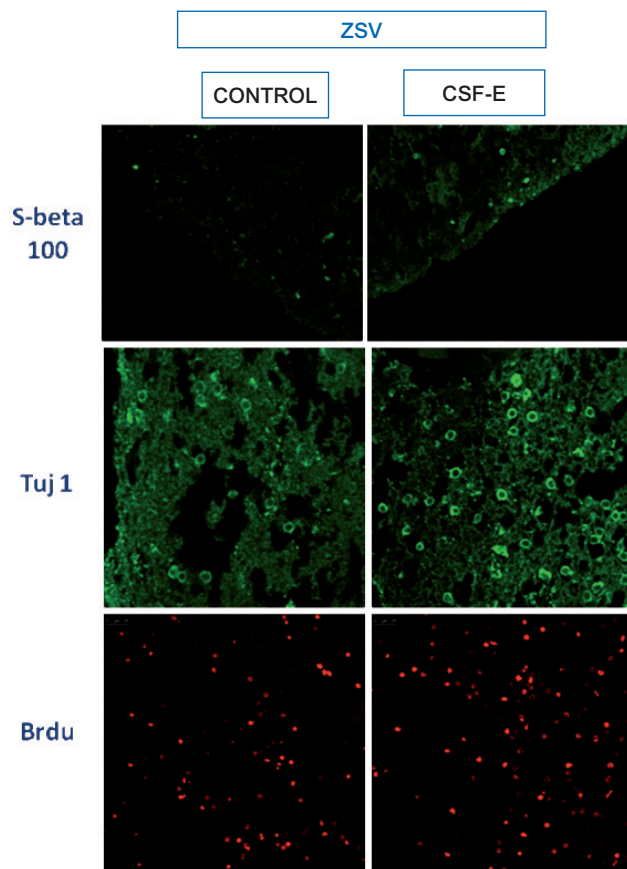


Figura 9. ZSV.

5. INFORME TERCER CUATRIMESTRE

El proyecto de investigación se ha desarrollado con normalidad de acuerdo con lo previsto inicialmente, y los objetivos alcanzados han sido adecuados a la disponibilidad presupuestaria.

5.1. Resultados obtenidos

En este último cuatrimestre, empleando la metodología descrita en el primer informe (19-6-2010), hemos seguido avanzando en nuestro estudio de localización y tipificación de las células madre en las secciones de ratón adulto, en el hipocampo y la zona subventricular, estudiando los cambios que se producen en ellas al someterlas a la influencia de factores embrionarios mediante implante de microesferas impregnadas en CSF embrionario, en este último periodo nos hemos centrado en valorar y cuantificar nuestros resultados.

Además en el último semestre, hemos procedido al establecimiento y expansión de una colonia de animales Knockout para el FGF-2 y puesta en marcha de los estudios sobre células madre del SNC adulto en secciones

histológicas (cultivo in vitro de secciones de cerebro adulto de estos ratones).

A continuación detallaremos los resultados más relevantes obtenidos durante el tercer cuatrimestre:

5.1.1. Valoración y cuantificación de los resultados obtenidos

1. Cultivo de hipocampo

En los cultivos Control, hemos demostrado que el hipocampo muestra una estructura morfológica normal y el grado de supervivencia celular (presencia de células apoptóticas valorado por la técnica de TUNEL) es sólo ligeramente superior al de las secciones de hipocampo sin cultivar. Este dato indica que las condiciones de cultivo son adecuadas. En estos cultivos la presencia de células tubulina positiva (neurogénesis) es escasa y en condiciones normales se observan grupos aislados de células en la zona subgranular del giro dentado.

Por el contrario, en las secciones de hipocampo cultivadas en presencia de CSF-E el número de células apoptóticas es similar al de las secciones control, pero el número de células $\beta 3$ Tubulina positiva en el giro dentado se incrementa significativamente (ver imágenes y gráfica, adjuntas), apreciándose numerosos grupos aislado de hasta 5-6 células positivas, que por su localización parecen emigrar de la zona subgranular hacia la capa granular del giro dentado.

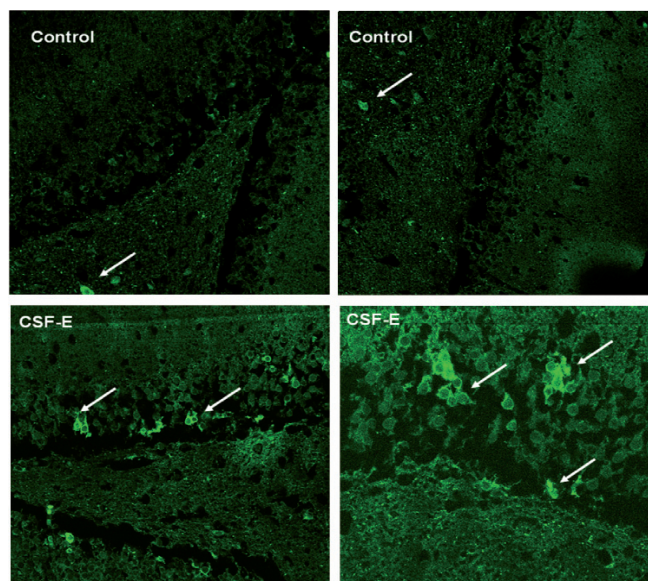


Figura 10. Cultivo de hipocampo.

2. Cultivo de zona subventricular (zsv):

En los cultivos Control, también en la zona subventricular y el estriatum muestran una estructura morfológica normal indicando que las condiciones de cultivo son adecuadas. En estos cultivos la presencia de células con núcleo BrdU +, muestra células con capacidad replicativa que en su mayor parte son precursores neuronales en fase proliferativa, una parte significativa de estas células coexpresa $\beta 3$ Tubulina y por tanto se trata de neuronas jóvenes que provienen de precursores con actividad proliferativa. Igualmente en los cultivos control se aprecian células

BrdU + que coexpresan Calretinina indicando que algunas de esas neuronas ha alcanzado un mayor grado de maduración neuronal y en la "Rostral Migratory Stream" aparecen algunas células que coexpresan BrdU y Doblecortina tratándose de neuronas con capacidad migratoria, generadas de a partir de precursores (ver imágenes adjuntas).

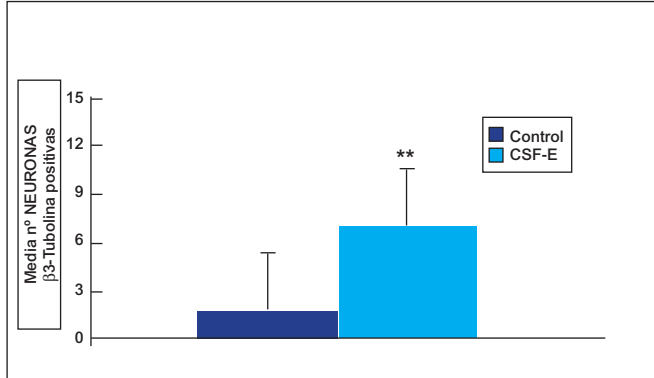


Figura 11. Medida número neuronas.

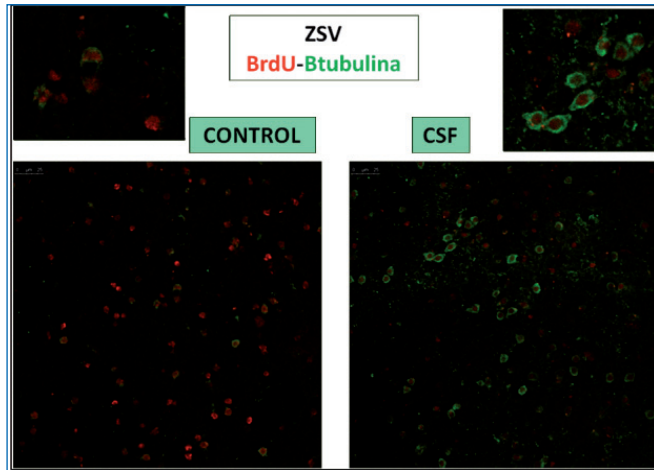


Figura 12. ZSV.

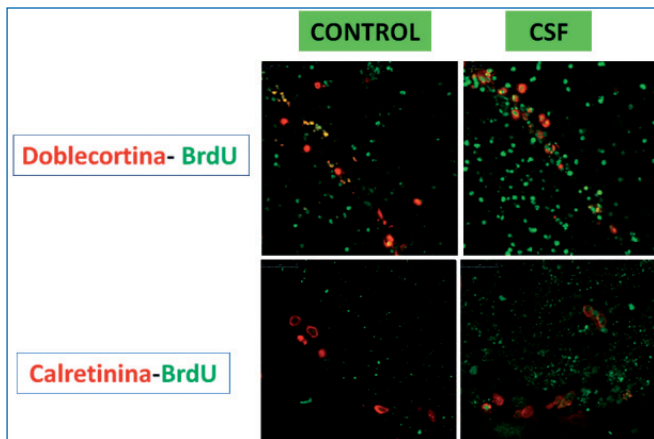


Figura 13. Doblecortina-BrdU y Calretinina-BrdU.

En las secciones de ZSV cultivadas en presencia de CSF-E, como se puede observar en las gráficas adjuntas, el número de células con núcleo BrdU+ es discreta pero significativamente mayor que en los controles, sin embargo el número de células que coexpresan BrdU y β3 tubulina se incrementa dramáticamente y también se in-

crementa el número de neuronas maduras (calretinina +) y el de neuronas migratorias en la rostral migratory stream (Doblecortina +), en ambos casos coexpresando BrdU, es decir generadas a partir de precursores neuronales.

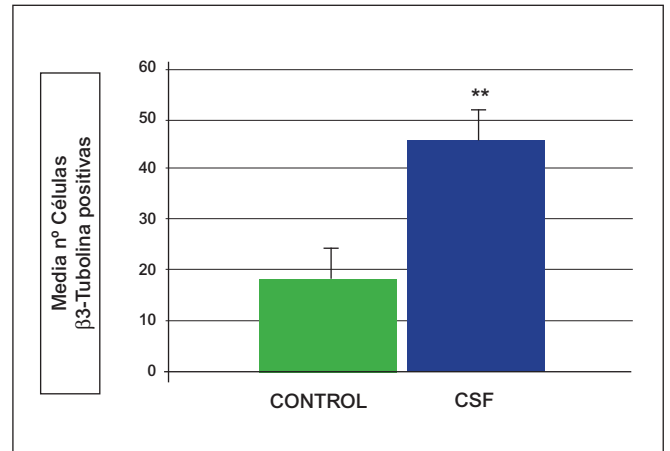


Figura 14. Medida número células β3-Tubulina positivas.

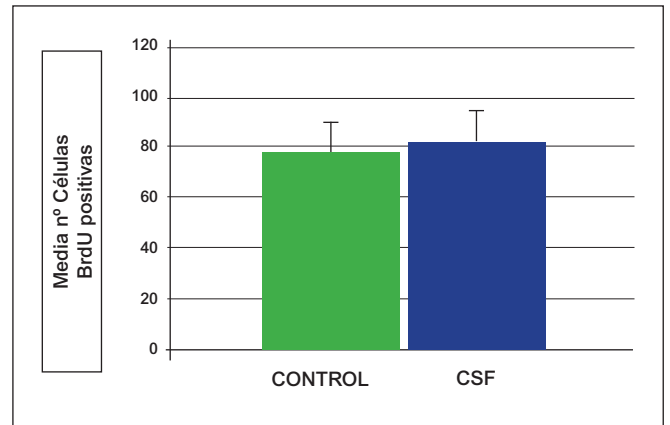


Figura 15. Medida número células BrdU positivas.

Los resultados obtenidos, tanto en los cultivos de hipocampo como en la zona subventricular, demuestran que la capacidad neurogénica del cerebro de mamíferos adultos es notablemente mayor que la que desarrolla en condiciones normales y que los estímulos neurogénicos del Fluido Cerebroespinal embrionario son capaces de activar "in situ" el proceso de neurogénesis a partir de progenitores neuronales de cerebro adulto, que parecen seguir un comportamiento de maduración y emigración normal.

5.1.2. Expansión de la colonia de ratones transgénicos (Ko para FGF2) y valoración de la influencia del e-csf sobre el comportamiento de las células madre del cerebro de roedor adulto

Tras iniciar la expansión de la colonia de ratones mutantes Ko FGF-2 (Ko2) y utilizando la misma metodología, en este último cuatrimestre se han realizado cultivos de secciones de hipocampo cerebral adulto de estos ratones en las condiciones anteriormente descritas.

En primer lugar hemos podido comprobar que, en condiciones normales, estos ratones tienen un nivel de neurogénesis en el giro dentado menor que los de las cepas silvestres (wild type). Nuestros resultados (ver tabla

CULTIVO SELECCIONES HIPOCAMPO DE RATÓN Ko2 (Nestina)

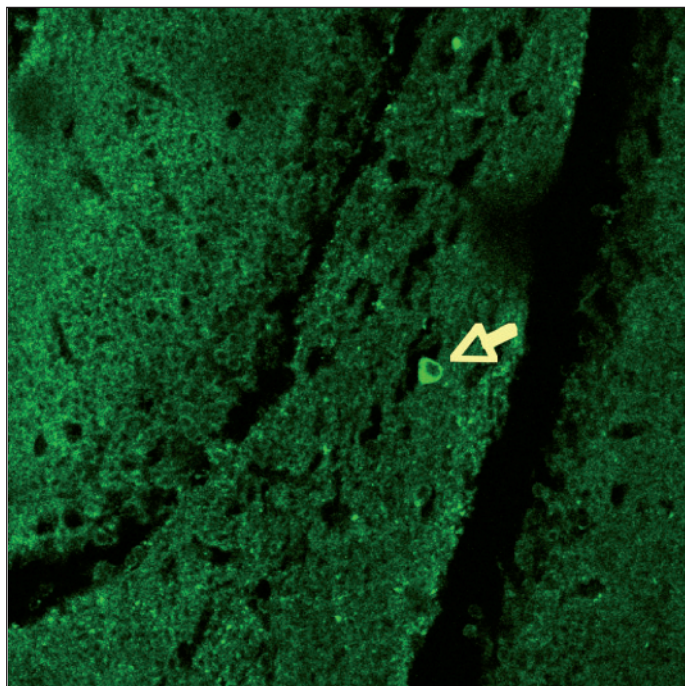


Figura 16. E-CSF Ko2

e imágenes adjuntas) demuestran que en los cultivos de hipocampo de los Ko2 la administración de CSF embrionario de ratón normal (E-CSF wild type) incrementa notablemente la neurogénesis, sin embargo, la administración de CSF embrionario de ratón Ko2 induce un efecto notablemente menor. De estos datos se deduce que el ratón Ko2 tiene una capacidad neurogénica reducida a nivel del hipocampo, que en buena medida podría deberse a una falta de estímulos apropiados en el CSF durante el desarrollo embrionario. Por otro lado, cabe destacar que en el cerebro de ratones Ko2 adultos, el CSF embrionario de ratones normales es capaz de activar la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo y por lo tanto, cabe esperar, que sus propiedades sean aplicables en la activación de procesos de neuroregeneración en circunstancias patológicas.

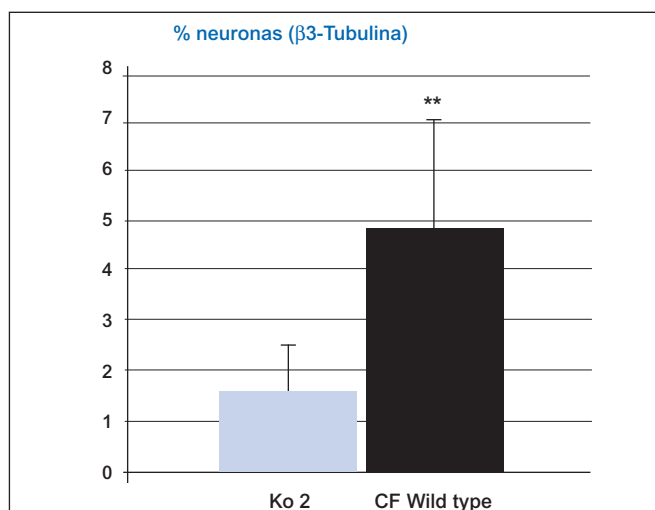


Figura 18. Porcentaje neuronas.

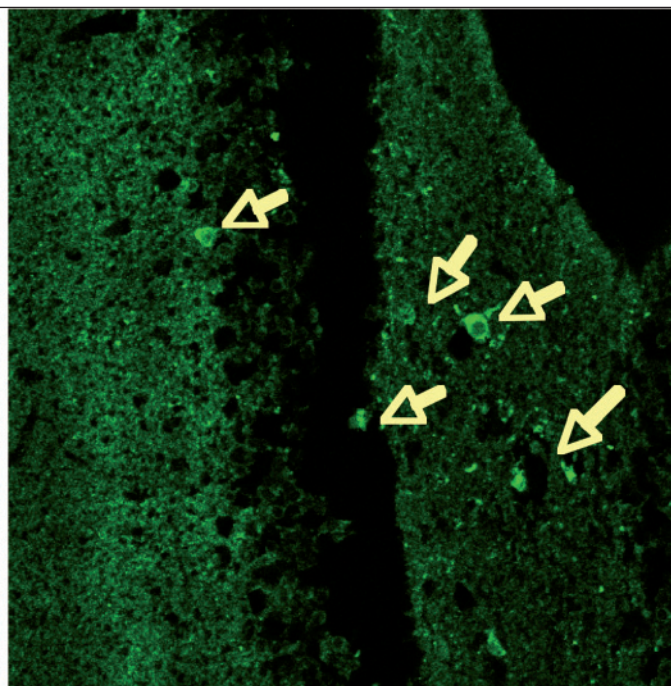


Figura 17. E-CSF wild type

6. CONCLUSIONES

1. El comportamiento de las células madre de sistema nervioso adulto es modificable mediante la aplicación de estímulos externos.
2. El CSF embrionario es capaz de inducir un incremento significativo en la actividad mitótica y sobre todo en la actividad neurogénica en el SNC adulto de roedores, tanto en el hipocampo como en la zona subventricular.
3. El CSF-E actúa sobre células madre derivadas de astrocitos en el cerebro de ratones adultos.
4. El CSF-E induce un potente efecto mitogénico que expande la población de precursores neuronales en el cerebro de ratones adultos.
5. La neurogénesis inducida por el CSF-E parece conducir a la formación de novo de neuronas maduras.
6. La presencia de CSF de embriones normales (Wild type) es capaz de activar la neurogénesis en un modelo de sistema nervioso central adulto con déficit neuronal congénito
7. Estos resultados avalan nuestra hipótesis de que el E-CSF puede contener información clave para el desarrollo de estrategias de neuroregeneración.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este proyecto. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.