

Neurogénesis de células progenitoras de la zona subventricular

Santos-Marcial Edgar*

RESUMEN

Desde la etapa embrionaria la zona subventricular juega un papel importante en la formación del sistema nervioso central, de esta zona parten las diferentes capas de la corteza cerebral. Aun después del desarrollo embrionario, esta zona se mantiene activa, produciendo neuronas que viajan al bulbo olfatorio. Al igual que las células de la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, existen líneas de investigación a fin de comprender mejor la neurogénesis dado su potencial en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y donde hay daño neuronal agudo. La neurogénesis se evalúan principalmente en términos de proliferación, diferenciación, determinación y supervivencia celular.

Palabras clave: células madre, células progenitoras, diferenciación, desarrollo, migración, neurogénesis, proliferación, supervivencia, sistema nervioso central, zona subventricular.

Neurogenesis of progenitors cells of the subventricular zone

ABSTRACT

Suventricular Zone plays an important role in the embryo, because from this place, cortex layers are built. Even after embryonic development, this zone is active, producing new neurons that migrate to olfactory bulb. In the same way as subgranular cells from dentate gyrus, there is research focus in understanding of neurogenesis, because of its therapeutic potential, especially in degenerative diseases and neuronal lesion diseases such as epilepsy and stroke. Proliferation, differentiation, determination and survival are the main characteristics that are evaluated in neurogenesis experiments.

Key words: Subventricular Zone, neurogenesis, migration, stem cells, progenitors, proliferation, differentiation, survival, central nervous system development.

ESTUDIO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

Después del cierre del tubo neural, la vesícula del cerebro anterior consta de un neuroepitelio de una sola capa. Las células progenitoras y células madre deben proliferar, diferenciarse y migrar para generar el cerebro adulto.^{1,2}

Para estudiar los orígenes y la migración celular durante el desarrollo embrionario se utilizan diversas técnicas:

- **Vital dye.** Una tinta lipofílica e hidrofóbica se aplica en el tejido embrionario, el cual se une fuertemente a la membrana celular de las células al contacto. Pudiéndose marcar regiones celulares específicas y darles seguimiento. Sin embargo, tras muchas divisiones celulares, la tinta se diluye.
- **Quimeras.** Gracias a la capacidad de unir tejidos embrionarios de diferentes especies, se ha seguido la migración celular al presentar proteínas de membrana que hacen distinguibles a las células de las dos especies.
- **Marcadores celulares.** Se puede dar seguimiento a grupos celulares, por medio de marcadores celulares,

principalmente utilizando anticuerpos, los cuales, no siempre son muy específicos.

- **3H-Timidina.** Las células de interés son removidas de un animal donador, incubado con 3H Timidina. El cual se incorpora al núcleo celular durante la síntesis de ADN. Posteriormente se colocan en otro embrión y se les puede dar seguimiento por medio de autoradiografía. También tiene la desventaja que después de diversas divisiones, el marcador se diluye entre las células resultantes.
- **Retrovirus.** Se inyectan retrovirus en la región de interés con un gen marcador, el cual se incorpora al ADN celular, más tarde, es expresado por los descendientes celulares sin diluirse el efecto con el número de mitosis.

Cada método tiene sus ventajas y desventajas. La elección de ellos depende del presupuesto, el tiempo y esfuerzo que se emplea, en razón de la pregunta de investigación que se quiere contestar.³⁻⁷

Se forman tres clases de estructuras en el SNC:

1. **Multicapas con migración radial predominante:** Corteza, hipocampo y cerebelo.
2. **Multicapas con migración tangencial y radial.** Retina y médula espinal.
3. **Sin capas.** Tronco cerebral, mesencéfalo y diencéfalo.

La parte más compleja del desarrollo, por lo tanto, es el primer grupo, donde se conjugan diversos acontecimientos

* Experimental and Clinical Neurosciences. Elitenetzwerk Bayern. Universität Regensburg, Germany.
Financiamiento de beca de posgrado CONACYT-DAAD y SEP. México.

tos de manera ordenada para dar origen a las complejas estructuras del adulto.

NEUROGÉNESIS EN LA ZONA SUBVENTRICULAR Y MIGRACIÓN CELULAR (ZSV)

Dentro de ese neuroepitelio, por medio de la extensión de finos procesos, las células se polarizan, se orientan en el espacio. Se inicia la neurogénesis y algunas células forman una red, por la cual se inicia la migración celular hacia la corteza, agrupándose en diversas capas. Las células en división se encuentran siempre en la capa más inferior denominada “Zona Subventricular”.

Partiendo de la ZSV, algunas poblaciones celulares entran a gliogénesis seguidas de migración radial. Al final de la corticogénesis la ZSV genera oligodendrocitos e inteneuronas que migran a través del eje anteroposterior.⁸

El cerebro en desarrollo contiene zonas específicas que no existen en el cerebro adulto y con marcadores se ha revelado más cómo el desarrollo se lleva de adentro hacia afuera.⁹⁻¹¹

Al profundizar en estudios de casos donde sí hay defectos en la migración celular, se han encontrado defectos en la iniciación de la migración, como el caso de la mutación del gen de filamina A; durante la migración, tal como el caso de la mutación en los genes de lis1 y doblecortina; y en la terminación de la misma, como en el caso de la mutación en el gen de la reelina.

La mutación del gen de la filamina A produce heterotopia nodular periventricular nodular, en el caso del gen de lis1, Lissencefalia tipo 1, caracterizado por una banda heterotópica de neuronas subcorticales, visible en resonancia magnética. En el caso de la mutación en el gen de reelina, se produce la Lissencefalia tipo 2, caracterizada por una corteza desorganizada con polimicrogiria.^{12,13}

La ZSV continúa proliferando en el periodo posnatal, existiendo una población de células precursoras que migran constantemente al bulbo olfatorio a través del torrente migratorio rostral (en inglés Rostral Migratory Stream). Además, otro lugar donde se encuentran células progenitoras y células madre es en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, cumpliendo un papel importante en la memoria espacio-temporal.¹⁰

Dado que la mayoría de las neuronas en el SNC adulto son terminalmente diferenciadas, y no son reemplazadas cuando mueren. En estas zonas mencionadas radican esperanzas para encontrar estrategias terapéuticas con bases en la neurogénesis para tratar enfermedades neurodegenerativas, enfermedad vascular cerebral entre otras donde hay muerte neuronal.

EVALUACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS

La neurogénesis es modulada por diferentes factores al nivel de proliferación, determinación celular, diferenciación y supervivencia. Aún poco se sabe sobre los mecanismos moleculares, pero se tienen modelos experimentales de algunas enfermedades, con los cuales se ha visto que tras ciertos daños cerebrales, existen factores que incrementan la neurogénesis. En modelos de enfermedades neurodegenerativas y bajo situaciones patológicas se ha visto un decremento en la neurogénesis en animales de laboratorio. Se pueden emplear también ratones Knock Out (KO), pero es aún un reto contar con un KO condicional, ya que por razones obvias los mecanismos neurogénicos tienen importancia vital en el desarrollo embrionario.¹⁴

En la Universidad de Regensburg, en Alemania, con éxito se logró aislar las células de estas zonas de cerebros de ratones y ratas, a fin de cultivarlas, caracterizarlas y estudiarlas *in vitro* (Figura 1).

Para estudiar la neurogénesis a los niveles mencionados, se han seleccionado factores de crecimiento y otras moléculas con un rol en el sistema inmunológico, a fin de evaluar los efectos en células progenitoras.¹⁵⁻¹⁷

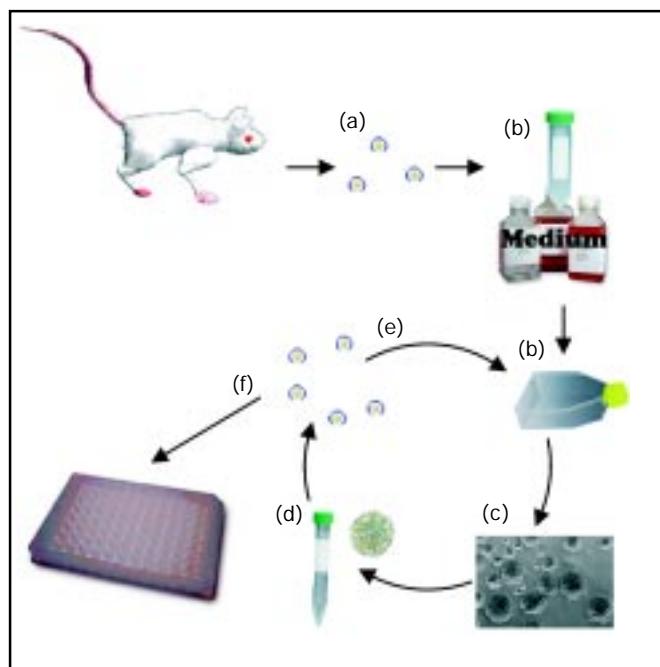


Figura 1. Se aislan las células progenitoras neuronales (a) de rata o ratón, (b) se ponen en medio de cultivo, (c) tras unos días se forman neuroesferas, (d) por medio de proteasas se disocian las células progenitoras. Entonces se calcula la concentración, (e) unas se ponen de nuevo a cultivar, y (f) otras se ocupan para realizar los experimentos.

Para evaluar la proliferación celular se pueden ocupar diversas técnicas, entre ellas la técnica de incorporación de bromodeoxiuridina al ADN celular, tras el cultivo con factores de crecimiento, se analiza la cantidad de ADN a través de un ELISA. Otra forma de hacerlo es a través de MTS assay. Éste es un método colorimétrico, en el cual el componente es degradado por actividad mitocondrial, cambiando de color, hecho que refleja de forma indirecta en número de células vivas. Existen otros métodos, tan simples como el conteo celular directo, hasta otros más complejos. La constante es que se deben añadir los factores que se desean estudiar en algunos momentos del cultivo, a fin de evaluar si existe un incremento o decremento de la cantidad celular.

Para evaluar la apoptosis, existe una prueba que se llama TUNEL Assay para detectar fragmentos de ADN producidos tras la cascada apoptótica.

La diferenciación celular, se realiza poniendo a las células en medio de cultivo, sobre laminillas, con algunos factores que las estimulen a diferenciarse, como es el caso de suero bovino, adicionalmente se le agrega el factor que se deseé estudiar. Tras unos días, por medio de anticuerpos fluorescentes específicos para marcadores de diferenciación para neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y de células indiferenciadas, se cuentan bajo el microscopio de fluorescencia y se determina la cantidad relativa de cada una de ellas.

La expresión de proteínas se realiza a través de Western Blot y el análisis de ARN a través de PCR. Dando la posibilidad de ver qué vías y componentes celulares se regulan con el factor estudiado.

Para analizar en qué parte del ciclo celular se encuentran las células, se practica un FACS análisis. El cual utiliza un citómetro de flujo, y cuenta las células tras incubar a las células con un anticuerpo que define en qué parte del ciclo se encuentran.

Ya que algunos factores pueden proteger a la célula contra daño celular, eso se evalúa seleccionando algunas sustancias citotóxicas, las cuales se agregan después de un tiempo de incubación con el factor estudiado. Se cuentan las células sobrevivientes y/o se analiza cuántas entraron en apoptosis con los métodos ya descritos.

Adicionalmente, se pueden evaluar los efectos del factor estudiado *in vivo*, al infundir el factor deseado en el animal y buscar la expresión de alguna proteína que se crea que se sobre expresa. Como el caso de alguna inmunohistoquímica.^{16,18}

En este laboratorio se desarrolló una nueva herramienta basada en la expresión del gen de doblecortina, la cual es un marcador de diferenciación neuronal. Se insertó el gen de luciferasa, dando la capacidad de producir luz a la célula insertándolo cerca del promotor de doblecortina. Siempre que se generen células neuronales nuevas, se expre-

sa el gen de doble cortina y al mismo tiempo se expresará la luciferasa, de forma que se pueden obtener imágenes en vivo de la neurogénesis en el cerebro del animal.

CONCLUSIÓN

Las células de la ZSV proveen una fuente de células madre para el desarrollo cerebral, y aún en la edad adulta, se mantiene activa en términos de neurogénesis. Es posible tomar células de esa zona y evaluar en cultivo y en vivo los efectos de factores de crecimiento, a fin de indagar de qué manera podrían tener un papel positivo o negativo en la neurogénesis. De la misma forma, se pueden evaluar molecularmente la regulación y en situaciones fisiológicas y patológicas a través de modelos de enfermedades y animales genéticamente modificados.

La realización de experimentos con células madre y células progenitoras no se deberían limitar a laboratorios con una gran infraestructura, esta área de las neurociencias tiene aún un largo camino por recorrer.

REFERENCIAS

1. DE Bellard ME, Barembaum M, Arman O, Bronner-Fraser M. Lunatic fringe causes expansion and increased neurogenesis of trunk neural tube and neural crest populations. *Neuron Glia Biol* 2007; 3(2): 93-103.
2. Ito K, Kawasaki T, Takashima S, Matsuda I, Alba A, Hirata T. Semaphorin 3F confines ventral tangential migration of lateral olfactory tract neurons onto the telencephalon surface. *J Neurosci* 2008; 28(17): 4414-22.
3. Karasiewicz J, Sacharczuk M, Was B, Guszkiewicz A, Korwin-Kossakowski M, Gorniewska M, et al. Experimental embryonic-somatic chimaerism in the sheep confirmed by random amplified polymorphic DNA assay. *Int J Dev Biol* 2008; 52(2-3): 315-22.
4. Nagy N, Goldstein AM. Intestinal coelomic transplants: a novel method for studying enteric nervous system development. *Cell Tissue Res* 2006; 326(1): 43-55.
5. Serbedzija GN, Bronner-Fraser M, Fraser SE. A vital dye analysis of the timing and pathways of avian trunk neural crest cell migration. *Development* 1989; 106(4): 809-16.
6. Obasaju MF, Wiley LM, Oudiz DJ, Raabe O, Overstreet JW. A chimera embryo assay reveals a decrease in embryonic cellular proliferation induced by sperm from X-irradiated male mice. *Radial Res* 1989; 118(2): 246-56.
7. Hamanaka S, Nabekura T, Otsu M, Yoshida H, Nagata M, Usui J, et al. Stable transgene expression in mice generated from retrovirally transduced embryonic stem cells. *Mol Ther* 2007; 15(3): 560-5.
8. Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* 2002; 22(8): 3161-73.
9. Calingasan NY, Ho DJ, Wille EJ, Campagna MV, Ruan J, Dumont M, et al. Influence of mitochondrial enzyme deficiency on adult neurogenesis in mouse models of neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 2008.
10. Durbec P, Franceschini I, Lazarini F, Dubois-Dalcq M. In vitro migration assays of neural stem cells. *Methods Mol Biol* 2008; 438:213-25.
11. Dayer AG, Jenny B, Potter G, Sauvain MO, Szabó G, Vutskits L, Gascon E, Kiss JZ. Recruiting new neurons from the subventricular zone to the rat postnatal cortex: an organotypic slice culture model. *Eur J Neurosci* 2008; 27(5): 1051-60.

12. Ruggieri M, Spalice A, Polizzi A, Roggini M, Iannetti P. Bilateral periventricular nodular heterotopia with amniotic band syndrome. *Pediatr Neurol* 2007; 36(6): 407-10.
13. Hartmann D, De Strooper B, Saftig P. Presenilin-1 deficiency leads to loss of Cajal-Retzius neurons and cortical dysplasia similar to human type 2 lissencephaly. *Curr Biol* 1999; 9(14): 719-27.
14. Winner B, Couillard-Despres S, Geyer M, Aigner R, Bogdahn U, Aigner L, Kuhn HG, Winkler J. Dopaminergic lesion enhances growth factor-induced striatal neuroblast migration.
15. Stanic D, Paratcha G, Ledda F, Herzog H, Kopin AS, Hökfelt T. Peptidergic influences on proliferation, migration, and placement of neural progenitors in the adult mouse forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(9): 3610-5.
16. Wachs FP, Wunner B, Couillard-Despres S, Schiller T, Aigner R, Winkler J, Bogdahn U, Aigner L. Transforming growth factor-beta1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65(4): 358-70.
17. Wachs FP, Couillard-Despres S, Engelhardt M, Wilhelm D, Ploetz S, Vroemen M, et al. High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells. *Lab Invest*. 2003; 83(7): 949-62.
18. Wunner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 2002; 16(9): 1681-9.
19. Couillard-Despres S, Finkl R, Wunner B, Ploetz S, Wiedermann D, Aigner R, et al. In vivo optical imaging of neurogenesis: watching new neurons in the intact brain. *Mol Imaging* 2008; 7(1): 28-34.



Correspondencia: Edgar Santos Marcial
Dr. Gesslerstr. 11.
Zimmernr. 3001.
93051 Regensburg, Deutschland
dredgarsantos@hotmail.com