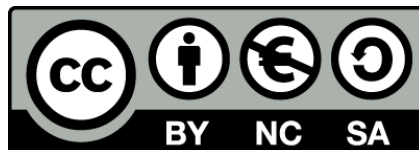




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Efecto de las citocinas en la neurogénesis endógena de la zona subventricular en condiciones fisiológicas

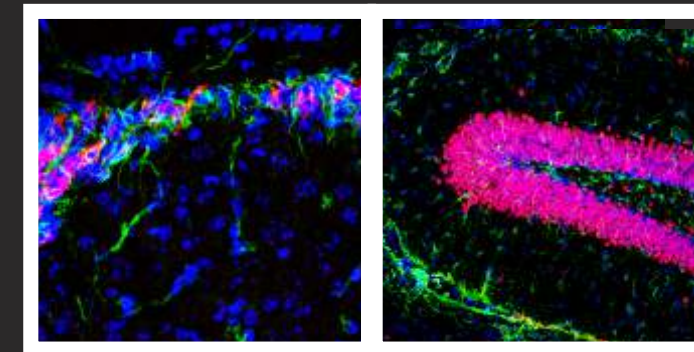
Unai Perpiñá Martín



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**



**Efecto de las citocinas en la
neurogénesis endógena de la
zona subventricular en
condiciones fisiológicas**

Programa de doctorado en Biomedicina (Universidad de Barcelona)

Doctorando: Unai Perpiñá Martín

Directora de tesis: Esther Pozas Pulido

ÍNDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	1
<u>INTRODUCCIÓN</u>	4
1. NEUROGÉNESIS ENDÓGENA	5
1.1 Origen del Sistema Nervioso	5
1.2 Desarrollo ventricular y de las NSCs	8
1.3 Neurogénesis adulta y sus nichos neurogénicos	13
1.3.1 La Zona Subventricular (SVZ)	13
1.3.1.1 <i>Citoarquitectura y marcadores de identidad celular</i>	13
1.3.1.2 <i>Migración de los neuroblastos de la SVZ: RMS o rostral migratory stream</i>	19
1.3.1.3 <i>El OB como diana mayoritaria de los neuroblastos originados en la SVZ adulta</i>	21
1.3.1.4 <i>Oligodendrogénesis</i>	25
1.3.2 Giro dentado del Hipocampo (GD)	26
2. MECANISMOS QUE REGULAN LA NEUROGÉNESIS	28
2.1 Moléculas endógenas implicadas en la regulación de la neurogénesis	28
2.1.1 Sonic Hedghog (Shh)	28
2.1.2 Notch	30
2.1.3 Wnt	32
2.1.4 Bone Morphogenic Proteins	32
2.1.5 Neurotrofinas	34
2.1.6 Otros factores de crecimiento	35
2.1.7 La vía de señalización JAK-STAT	37
2.1.8 Otros reguladores de la neurogénesis	38
2.2 Mecanismos epigenéticos de regulación de la neurogénesis	39
2.3 El entorno y la neurogénesis	41
2.3.1 Olores	41
2.3.2 Enriquecimiento ambiental	41
3. INFLAMACIÓN, CITOCINAS Y LOS NICHOS NEUROGÉNICOS EN EL ADULTO	43
4. PAPEL DE LAS CITOCINAS EN LA NEUROGÉNESIS	49
<u>OBJETIVOS</u>	54
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	57
1. ANIMALES	58
1.1 Mantenimiento de colonias	58
1.1.1 Animales deficientes para IL-10	58
1.2 Genotipaje de animales producidos por el apareamiento entre parentales heterocigotos para la IL-10	59
1.2.1 Extracción de ADN	59
1.2.1.1 <i>Material y reactivos</i>	59
1.2.1.2 <i>Procedimiento</i>	59
1.2.2 Amplificación por PCR	59

1.2.2.1 <i>Material y Reactivos</i>	59
1.2.2.2 <i>Procedimiento</i>	60
1.2.3 Gel de agarosa	60
1.2.3.1 <i>Materiales y reactivos</i>	60
1.2.3.2 <i>Procedimiento</i>	61
1.2.4 Análisis de los resultados	61
2. ADMINISTRACIÓN DE CITOCINAS <i>IN VIVO</i> MEDIANTE BOMBAS DE INFUSIÓN OSMÓTICAS (ALZET®)	62
2.1 Técnica de implantación de Bombas de Infusión Osmóticas Intracerebroventricular (ICV)	62
2.1.1 Partes de la Bomba de Infusión	63
2.1.2 Preparación de las Bombas de infusión para su implantación	64
2.1.3 Utilización de gases y anestesia	65
2.1.4 Cirugía	65
2.1.4.1 <i>Material necesario</i>	65
2.1.4.2 <i>Procedimiento</i>	66
2.2 Seguimiento del animal	68
2.3 Soluciones administradas en bombas de infusión ICV	68
2.3.1 Vehículo	68
2.3.2 IFN γ	68
2.3.3 IL-10	68
2.4 Administración de BrdU	68
2.4.1 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)	68
2.4.2 Grupos experimentales de animales para el marcaje de células nuevas con BrdU	69
2.4.2.1 <i>Animales administrados ICV con IFNγ durante 7 días (ganancia de IFNγ a 7d)</i>	69
2.4.2.2 <i>Animales administrados ICV con IFNγ para describir procesos de diferenciación (ganancia de IFNγ a 4 d)</i>	69
2.4.2.3 <i>Para describir la integración de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio OB</i>	69
3. OBTENCIÓN DE MESTRAS PARA HISTOLOGÍA. PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES	70
3.1 Muestras para análisis histológico	70
3.1.1 Perfusión transcardiaca	70
3.1.1.1 <i>Material</i>	70
3.1.1.2 <i>Procedimiento</i>	71
3.1.2.3 <i>Postfijación</i>	71
3.2 Obtención de cortes con criostato	71
3.2.1 Procedimiento y crioconservación	71
3.2.1.1 <i>Procedimiento</i>	72
3.2.2 Preparación de portaobjetos gelatinados	72
3.2.2.1 <i>Material</i>	72
3.2.2.2 <i>Procedimiento</i>	73
4. TÉCNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA	73
4.1 Inmunofluorescencia en secciones histológicas y en células	73
4.1.1 Inmunofluorescencia en secciones histológicas	75

4.1.1.1 <i>Material</i>	75
4.1.1.2 <i>Inmunofluorescencia en secciones histológicas</i>	75
4.1.2 <i>Protocolo inmunofluorescencia sobre cultivos en monocapa</i>	76
4.1.2.1 <i>Material</i>	76
4.1.2.2 <i>Procedimiento</i>	76
4.2 <i>Anticuerpos empleados</i>	78
5. ANALISIS DE LAS MUESTRAS POR MICROSCOPIA	79
5.1 <i>Análisis por microscopía confocal</i>	79
5.2 <i>Análisis del OB por microscopía invertida de fluorescencia</i>	79
5.3 <i>Análisis de las inmunofluorescencias de cultivos celulares por microscopía invertida de fluorescencia</i>	80
6. ESTADÍSTICA	80
6.1 <i>Estadística de los valores obtenidos de las inmunofluorescencias sobre tejido adulto</i>	80
6.2 <i>Estadística de los valores obtenidos sobre las inmunofluorescencias en cultivos disociados primarios de SVZ</i>	80
<u>RESULTADOS</u>	82
Resultados Sección I: <i>Efectos del IFNγ sobre la neurogénesis normal en el cerebro adulto</i>	83
1. <i>Validación <i>in vitro</i> de los lotes de IFNγ para ser empleados <i>in vivo</i></i>	84
2. <i>Control de la administración intracerebroventricular (ICV) de citocinas</i>	87
3. <i>Efecto del IFNγ sobre la proliferación celular de la SVZ <i>in vivo</i></i>	89
4. <i>Acción del IFNγ sobre la población de neuroblastos (DCX+) de la SVZ</i>	92
5. <i>Alteración de la diferenciación celular en la SVZ inducida por IFNγ <i>in vivo</i></i>	94
5.1 <i>La diferenciación neuronal ante la presencia de IFNγ</i>	95
5.2 <i>La diferenciación oligodendroglial ante la presencia de IFNγ</i>	98
6. <i>El IFNγ provoca una disminución en la integración de nuevas en el OB</i>	101
Resultados Sección II: <i>Efectos de la IL-10 sobre la neurogénesis normal en el cerebro adulto</i>	104
1. <i>Efecto de la IL-10 sobre la proliferación celular de la SVZ <i>in vivo</i></i>	105
2. <i>La IL-10 incrementa la población de progenitores y reduce la población de neuroblastos <i>in vivo</i></i>	106
3. <i>La SVZ restablece las poblaciones celulares tras el cese de la acción de la IL-10</i>	108
4. <i>Efecto de la IL-10 en la diferenciación neuronal y oligodendroglial</i>	109
5. <i>La ausencia de IL-10 afecta la neurogénesis endógena de la SVZ</i>	110
<u>DISCUSIÓN</u>	115
1. <i>El IFNγ como molécula antiproliferativa de la SVZ</i>	118
2. <i>El IFNγ en la diferenciación celular</i>	121
3. <i>Efecto de la IL-10 en la neurogénesis del eje SVZ-OB</i>	124
4. <i>Posible acción del IFNγ y la IL-10 en la neurogénesis ante lesión cerebral</i>	127
<u>CONCLUSIONES</u>	132
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	135

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico
AINEs: Antiinflamatorios No Esteroideos
AMPc: Adenosin monofosfato cíclico
Ara-C: cytosine- β -d-arabinofuranoside
Ascl1: Achaete-scute complex homolog
Bax: BCL2-associated X protein
BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor
BHE: Barrera Hematoencefálica
BLBP: Brain Lipid Biding Protein
BMPs: Bone Morphogenic Proteins
bp: pares de bases
BrdU: 5-bromo-2-desoxiuridina
CC: Cuerpo calloso
CCR2: C-C chemokine receptor 2
Cb: Calbindina
Cr: Calretinina
CNTF: Cilliary Neurotrophic Factor
CTX: Cortex
CXCR4: C-X-C chemokine receptor 4
DAPRPP-32: Dopamine and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein
dbcAMP: Dibutiril Adenosin mofosfato cíclico
DCX: Doblecortina
Dlx2: Distal-less homeobox 2
Dnmts: DNAmetiladas
EAE: Encefalomiелitis Autoimmune Experimental
EGF: Epidermal Growth Factor
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
EPL: External Plexiform Layer
EPO: Eritropoyetina
FGF-2: Fibroblast Growth Factor
GABA: Ácido Gamma-Amino-Butírico
Gadd45b: Growth arrest and DNA damage induced gene-45-be
GCL: Granular cell layer
GD: Giro Dentado
GDNF: Glial cell-Derived Neurotrophic Factor
GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP: Green Fluorescent Protein
GL: Glomerular Layer
GLAST: Glutamate Aspartate Transporter
HATs: Acetiltransferasas
HDACs: Desacetiltransferasas
Hes: Hairy and enhancer of split
Hz: Heterocigoto
IBA-1: Ionized calcium-binding adapter molecule 1
ICV: Intracerebroventricular
IFN γ : Interferón γ
IFN γ R: Interferón Gamma Receptor
IGF-1: Insuline Growth Factor 1
IL: Interleucina
i.p: intraperitoneal
IPL: Internal Plexiform Layer
JAK: Janus Tyrosine Kinase
KO: Knock-Out

LCR: Líquido Cefalorraquídeo
LIF: Leuquemia Inhibitory Factor
LPS: Lipopolysaccharides
LV: Lateral Ventricle
MCP1: Monocyte chemoattractant protein 1
MHC-I, MHC-II: Major Histocompatibility Complex I y II
ML: Mitral Layer
NG2: Neuronal/Glial2
NGF: Nerve Growth Factor
NICD: Notch Intracellular Domain
NSCs: Células Madre Neurales
NT-3: Neurotrofina 3
OB: Bulbo olfatorio
Olig2: Oligodendrocyte lineage transcription factor 2
OPC: Oligodendrocyte Precursor Cell
PBS: Phosphate Buffered Saline
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDGF: Platelet derived growth factor
PEDF: Pigment Epithelium Derived Factor
PG: Periglomerulares
PSA-NCAM: PolySialylated-Neural Cell Adhesion Molecule
RC2: Radial Glia Cell Marker 2
RMS: Rostral Migratory Stream
S.E.M: Error estándar de la media
SDF1 α : Stromal cell-derived factor 1 alfa
Shh: Sonic hedgehog
siRNA: Small interfering RNA
SN: Sistema Nervioso
SNC: Sistema Nervioso Central
SOCS: Suppressors Of Cytokine Signaling
SOX2: SRY-box 2 (*Sex determining Region Y-box 2*)
SPT: Séptum
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
STR: Estriado
SVZ: Subventricular Zone
TBE: Tris-Borato-EDTA
TGF: Transforming Growth Factor
TH: Tirosina Hidroxilasa
TLX: Trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen
TN-C: Tenascina-C
TNF α : Tumor Necrosis Factor alfa
TNF- β : Tumor Necrosis Factor beta
TrkB: Tropomyosin-related kinase B
VEGF: Vascular endotelial growth factor
Vax1: Ventral anterior homeobox 1
VZ: Zona Ventricular
Wm: Sustancia blanca
WT: Wild Type

INTRODUCCIÓN

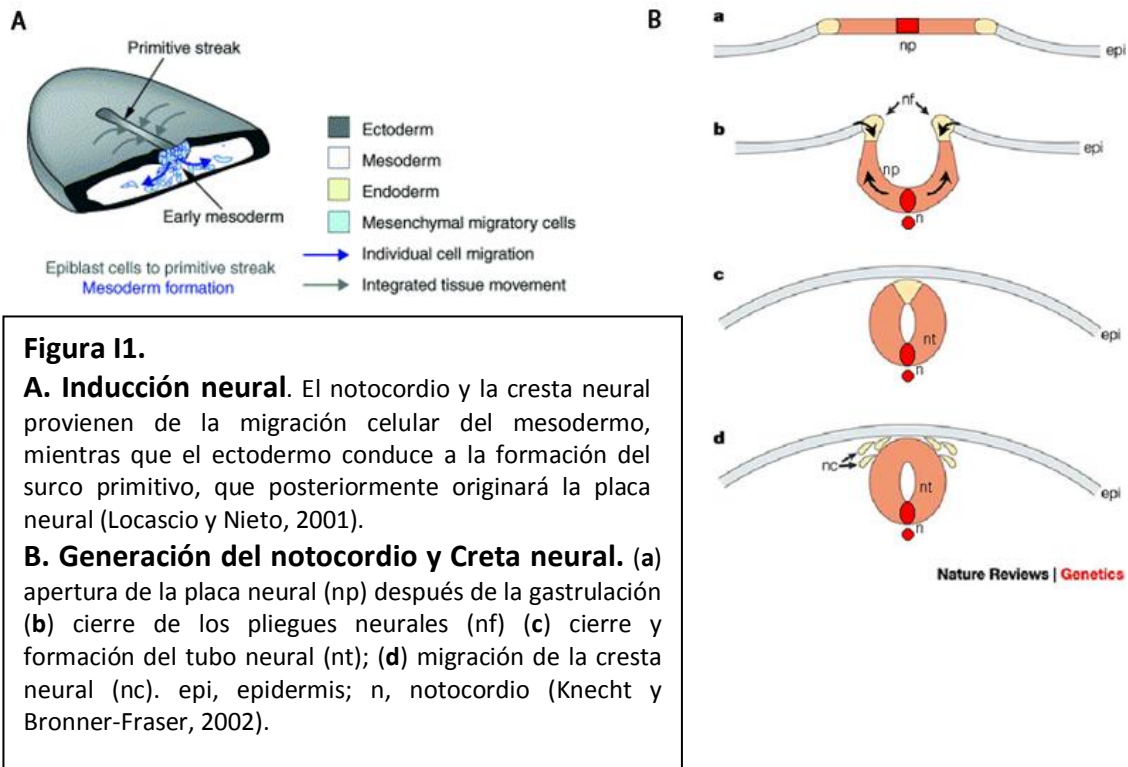
1. NEUROGÉNESIS ENDÓGENA

1.1 Origen del Sistema Nervioso

En primer lugar se genera una lámina plana de células en la superficie dorsal del embrión constituida por tres partes: ectodermo, mesodermo y endodermo. El ectodermo es el que dará origen al sistema nervioso central (SNC), mientras que el mesodermo genera la formación del notocordio, necesaria para el proceso de gastrulación (Cowan, 1987; Herschkowitz, 1988). El notocordio envía señales al ectodermo para provocar la diferenciación de las células neuroectodermales, proceso denominado neurulación, que generará el desarrollo de un epitelio denominado placa neural. La placa neural posteriormente se invaginará sobre si misma originando el tubo neural que genera las estructuras del cerebro y de la médula espinal (ver figura I1). Posteriormente se origina la cresta neural, la cual está implicada en la diferenciación y migración de muchos tipos celulares necesarios para el correcto desarrollo embriológico. Tras la formación del tubo neural y como resultado de una serie de modificaciones estructurales, pliegues e invaginaciones, se desarrolla el cerebro anterior (prosencefalo), cerebro medio (mesencéfalo) y cerebro posterior (romboencéfalo) (Purves et al., 2004). Dichas regiones del cerebro conforme se va avanzando en el desarrollo adquieren más modificaciones estructurales secundarias, como por ejemplo la aparición de las amígdalas, bulbos olfatorios, ganglios basales, hipotálamo o hipocampo.

El desarrollo del cerebro durante la etapa embrionaria requiere una red de señales estimuladoras o inhibitorias que en su conjunto promueven todos los procesos encargados en la génesis del cerebro y su correcto desarrollo. Las distintas fases de desarrollo neural presentan un carácter temporal y regional y pueden extenderse hacia el desarrollo postnatal tardío y la madurez.

Los procesos que se llevan a cabo durante el desarrollo del SNC son extremadamente complejos y cuentan con la intervención de numerosos factores tanto genéticos como ambientales. Después del nacimiento, ocurre un proceso de plasticidad sináptica, en el cuál los factores ambientales y experiencias provocan cambios en el SN, influenciando el desarrollo de los circuitos neuronales.



Es fundamental entender como las células madre neurales (NSCs) cambian a lo largo de los distintos estadios de la vida (ver figura 12). Durante el desarrollo embrionario las NSCs cambian su morfología y son capaces de producir una progenie celular diferente a la de otras etapas de la vida, debido en gran parte a que los perfiles de expresión génica varían durante las distintas fases del desarrollo (Abramova et al., 2005). Esta activación génica parece que puede ir hacia delante pero no hacia detrás, es decir, los progenitores de una edad avanzada no pueden producir las células que producen los progenitores de edades más tempranas (Shen et al., 2006), lo que sugiere que las NSCs no pueden re-especificar su patrón de expresión celular y génico por señales ambientales de otros estadios anteriores. Estudios en los que se trasplantaron NSCs de animales postnatales en el cerebro embrionario, demostraron como estas NSCs no eran capaces de generar todos los tipos de celulares apropiados para el momento en el que se encontraban (Grimaldi et al., 2005). En este punto, es muy importante tener en cuenta que las modificaciones epigenéticas de cada estadio comprometen la actividad futura de dichas células.

Introducción

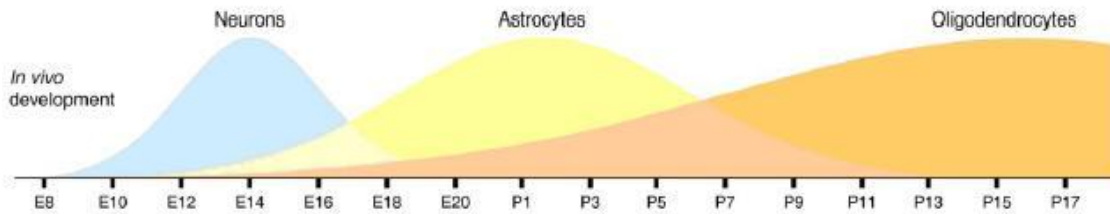


Figura I2. Secuencia temporal en la generación de los distintos tipos celulares durante el desarrollo del SNC de rata. Para ratón se considera la misma secuencia temporal con dos días de antelación. Puede observarse como la neurogénesis es lo primero que ocurre durante el desarrollo del SNC, mostrando su máximo en el periodo embrionario E14. Posteriormente se da un patrón de expresión glial; la formación de astrocytes tiene su máximo en el periodo postnatal P2 y la formación del linaje oligodendroglial tiene su máximo en el periodo postnatal P14 (Sauvageot y Stiles, 2002).

Como hemos expuesto anteriormente, la generación de neuronas durante el desarrollo embrionario se da antes que la gliogénesis. El cultivo *in vitro* de progenitores neurales de estadios embrionarios muestra como inicialmente se generan neuronas y una pequeña población de células multipotentes, y posteriormente se producen los astrocytes y oligodendrocytes (Qian et al., 2000). En este proceso de diferenciación y especialización de los distintos tipos celulares intervienen numerosos factores de crecimiento, morfógenos y otras moléculas que dirigen y establecen los territorios dorsoventrales (Merkle et al., 2013). Las células con características multipotentes interpretan estos gradientes de señales y responden generando la diversidad neural necesaria para el estadio de desarrollo en el que se encuentre el individuo. Así pues, determinadas moléculas actuando por la vía de señalización JAK/STAT, pueden alterar la secuencia temporal de expresión génica y provocar una astrogliogénesis prematura (Bonni et al., 1997). Por ejemplo, la activación por CNTF de células precursoras en desarrollo conduce a la activación de JAK1, STAT1 y STAT3 que provoca la diferenciación celular hacia el linaje astrogliar (Bonni et al., 1997); también se ha observado como la señalización de STAT3 actúa cooperando con la vía de señalización de Notch y la señalización de BMPs (Bone Morphogenic Proteins) para la formación glial durante el desarrollo del SNC (Taylor et al., 2007).

1.2 Desarrollo ventricular y de las NSCs

En las fases iniciales del desarrollo del SNC, las células implicadas en la proliferación y diferenciación del tejido nervioso son conocidas como células neuroepiteliales. Estructuralmente, las células neuroepiteliales son de estructura alargada y bipolar, y se disponen en una capa pseudoestratificada que entra en contacto apicalmente con el ventrículo y basalmente con la superficie pial. Esta capa de células en la superficie ventricular se denomina Zona Ventricular (VZ) o capa germinal (Merkle et al., 2006; Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009) (ver figura I3). Inicialmente, la división de las células neuroepiteliales es de carácter simétrica, generando células idénticas con características multipotentes. Posteriormente, las células neuroepiteliales cambian su patrón de expresión génica y comienzan a dividirse asimétricamente, generando una célula idéntica y otra célula que se diferenciará radialmente (Haubensak et al., 2004) (ver figura I4). En periodos embrionarios E9-E10 las células neuroepiteliales adquieren características de glía radial, expresando marcadores astrogliales como GLAST (Glutamate Aspartate Transporter), BLBP (Brain Lipid Biding Protein), RC2 o TN-C (Campbell et al., 2002), y una gran variedad de filamentos intermedios como Nestina o Vimentina (Levitt et al., 1980; Mori et al., 2005). Las células de la glía radial se mantienen en la VZ y del mismo modo que las células neuroepiteliales son bipolares, mostrando una prolongación basal que contacta con la superficie pial, y una prolongación apical con un cilio corto que entra en contacto con el ventrículo (Malatesta et al., 2003; Gotz et al., 2005; Kriegstein y Álvarez-Buylla 2009) (ver figura I3). Inicialmente, la función que se le atribuyó a la glía radial era la de actuar como sustrato y guía de la migración de los neuroblastos generados durante el desarrollo embrionario, posteriormente, se ha comprobado como la glía radial también actúa como célula madre neural durante los periodos de desarrollo embrionario, participando en la neurogénesis cortical (Malatesta et al., 2000; Hartfuss et al., 2001; Tramontin et al., 2002; Spassky et al., 2005; Kriegstein y Álvarez-Buylla 2009) (ver figura I4). De este modo, la glía radial también lleva a cabo divisiones simétricas para su auto-renovación celular y divisiones asimétricas produciendo un precursor neuronal o glial y otra célula de glía radial (Haubensak et al., 2004; Noctor et al., 2004; Kriegstein y Álvarez-Buylla 2009) (ver figura I3). Las células de glía radial tienen capacidad

Introducción

neurogénica y gliogénica mientras dura la histogénesis cortical, pero una vez que termina la generación y migración de neuronas, solamente son capaces de dar lugar a células gliales (Malatesta et al., 2000). Estructuralmente, cuando comienza la aparición de la glía radial, la zona germinal comienza a formar un epitelio pluriestratificado que entra en contacto internamente con la VZ formando la zona subventricular (SVZ), donde se encuentra una acumulación basal de neuronas postmitóticas y progenitores basales (Malatesta et al., 2008; Kriegstein y Álvarez-Buylla 2009) (ver figura I3).

Durante el periodo postnatal la región germinal cambia drásticamente disminuyendo su tamaño (ver figura I3) y a partir del estadio postnatal P15 la glía radial desaparece de la pared del ventrículo, aunque en muchas especies permanece en la edad adulta, tales como aves, lagartos, tortugas y peces (Altman, 1969; Álvarez-Buylla et al., 1990; Luskin, 1993; Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Peretto et al., 1999; García-Verdugo et al., 2002; Russo et al., 2004; Zupanc et al., 2006). El ventrículo en este periodo comienza a estar limitado por células endodiales ciliadas, que han sido generadas por la glía radial, y que entran en contacto con la SVZ (ver figura I3). A su vez, las células de la glía radial, en los mamíferos, se transforman en los astrocitos de la SVZ, considerados como las NSCs de la SVZ adulta. La relación entre la glía radial y los astrocitos de la SVZ fue demostrada inicialmente al marcar las células de la glía radial con el trazador celular fluorescente (Dil) y observar como a la vez que desaparecían las células de la glía radial durante el desarrollo, aparecían astrocitos marcados con Dil (Voigt et al., 1989). Estudios más recientes directamente visualizaron la transformación de la glía radial en astrocitos usando un trazador retroviral que se expresaba específicamente en las células de la glía radial y permitía observar *in situ* su transformación temporal (Noctor et al., 2001). Los astrocitos de la SVZ se encuentran localizados tras la capa de células endodiales que recubren el ventrículo lateral (LV) y a pesar de sufrir variaciones morfológicas muestran semejanzas con la glía radial, como el hecho de mantener un cilio primario, que se encuentra dispuesto entre la capa de células endodiales y en contacto con el interior del ventrículo (Mirzadeh et al. 2008).

La naturaleza astrocitaria de las NSCs de la SVZ adulta ha sido ampliamente demostrada. La identificación de las NSCs adultas fue llevada a cabo por el grupo de Álvarez Buylla, los experimentos *in vivo* que identificaron la población de NSCs en el adulto consistían por un lado, en el tratamiento intracerebroventricular (ICV) con el

Introducción

antimitótico cytosine- β -d-arabinofuranoside (Ara-C), el cual eliminaba toda la población celular de la SVZ de ratones adultos, excepto los astrocitos de la SVZ y las células endodiales que recubren el ventrículo (Doetsch et al., 1999a). A su vez, observaron como tras el tratamiento con Ara-C los astrocitos de la SVZ incorporaban timidina tritiada, mientras que otras células presentes en la SVZ como son las células endodiales no incorporaban la timidina tritiada, poniendo de manifiesto que los astrocitos de la SVZ tenían capacidad proliferativa. La inyección ICV de adenovirus que expresaban una proteína fluorescente (GFP) bajo el promotor de GFAP, marcador de astrocitos, demostró que la población de astrocitos de la SVZ era capaz de generar las neuronas que migrarán hasta el bulbo olfatorio (OB), como diana fisiológica (Doetsch et al. 1999a). A su vez, estudios *in vitro* con el modelo de neuroesferas determinaron como los astrocitos de la SVZ eran capaces proliferar y diferenciarse tanto al linaje neural como al linaje glial (Doetsch et al., 1999a). Posteriormente, otros trabajos corroboraron estas observaciones empleando animales transgénicos capaces de expresar la timidina kinasa bajo el promotor de GFAP. La timidina kinasa es sensible al antibiótico ganciclovir, por lo tanto el tratamiento de estos animales transgénicos con el antibiótico eliminaría selectivamente los astrocitos de la SVZ, observando finalmente una reducción en el número de nuevas neuronas producidas a partir de la SVZ y corroborando como la fuente endógena de las nuevas neuronas eran los astrocitos de la SVZ (Imura et al. 2003, Morshead et al. 2003).

Todos estos estudios contradijeron las primeras observaciones que atribuían inicialmente el papel de las NSCs de la SVZ adulta a las células endodiales (Johansson et al., 1999). Posteriormente, otros estudios también pusieron de manifiesto que las células endodiales no podían ser las NSCs en el adulto ya que estas se convertían en células postmitóticas durante el desarrollo y no podían formar neuroesferas *in vitro* (Chiasson et al. 1999, Capela y Temple 2002; Spassky et al. 2005).

Introducción

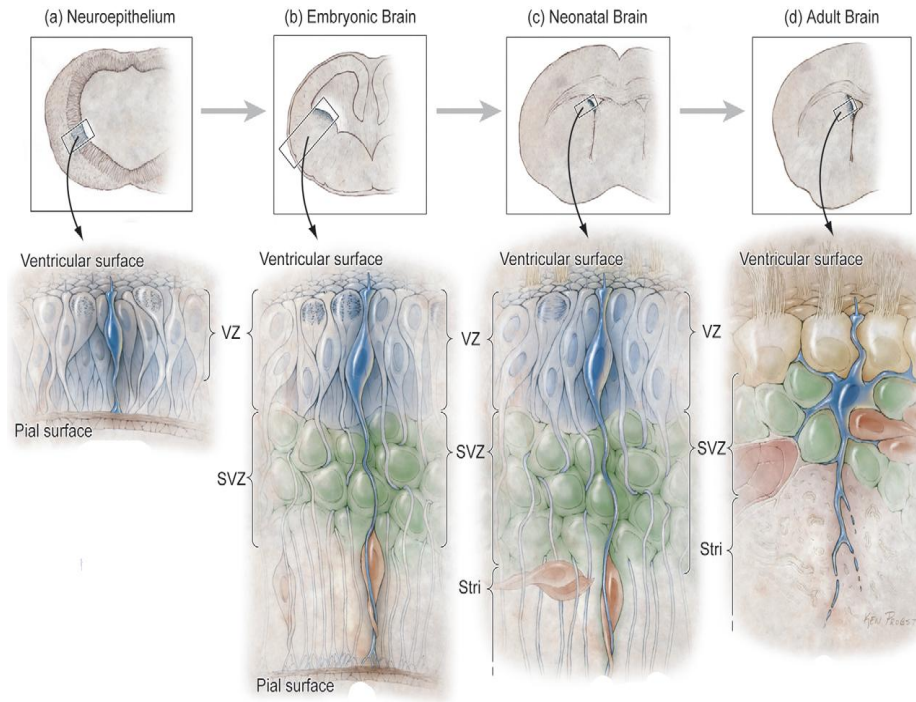


Figura 13. Desarrollo de las NSCs. **a.** En periodos iniciales del desarrollo del SNC son las células neuroepiteliales (azul) las encargadas en dividirse, en primer lugar de manera simétrica incrementando la población celular multipotente y posteriormente dividirse de manera asimétrica. **b.** Las células neuroepiteliales se transforman en células de la glía radial (azul), las cuales en su división asimétrica generan unos progenitores intermedios (verde) que generarán los neuroblastos (rojo). **c.** La glía radial permanece en el periodo postnatal generando neuronas, oligodendrocitos y células ependimales, pero también generando astrocitos que actuarán como las NSCs adultas. **d.** En el adulto la pared del ventrículo se encuentra totalmente tapizada por células ependimales (amarillo) y los astrocitos de la SVZ (azul) se encuentran internalizados en la SVZ con los progenitores intermedios (verde) y neuroblastos (rojo). En cualquier caso, en todos los estadios desde el embrión al adulto, la disposición de las NSCs permite el contacto con el interior del ventrículo gracias a su cilio primario. VZ: Zona Ventricular; SVZ: Zonas Subventricular; Stri: Estriado (Merkle et al., 2006).

Introducción

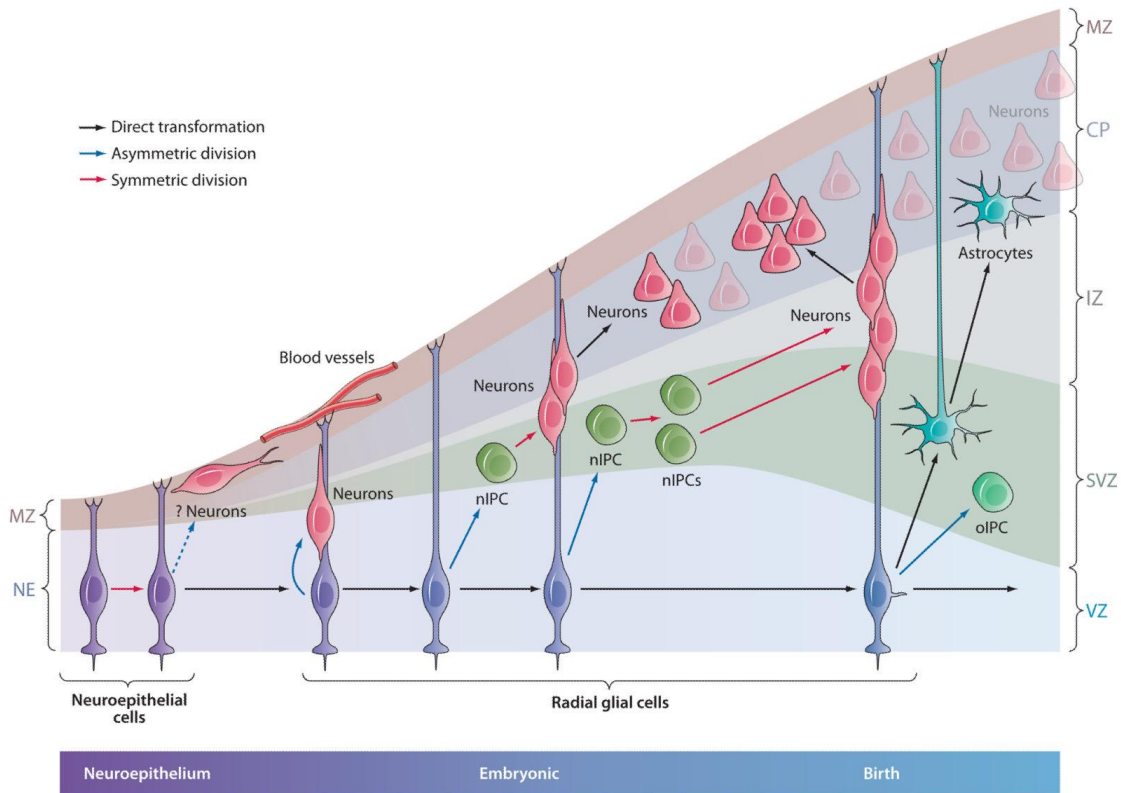


Figura 14. Desarrollo de las NSCs desde el desarrollo embrionario hasta el adulto. Las células neuroepiteliales generan las células de la glía radial durante el desarrollo embrionario por transformación directa. La glía radial se transforma en las células B o NSCs (astrocitos de la SVZ adulta). Estas células mantienen características similares a las células neuroepiteliales como la extensión apical de su proceso que termina en el ventrículo y un proceso basal que se encuentra en contacto con los vasos sanguíneos. Las flechas ilustran el tipo de división que se lleva a cabo; las flechas negras corresponde con las transformaciones directas que se dan entre **células neuroepiteliales-glía radial-astrocitos de la SVZ**; las flechas azules indican divisiones asimétricas y las flechas rojas determinan las divisiones simétricas. VZ: zona ventricular; SVZ: zona subventricular; NE: neuroepitelio; RG: glía radial; IPC: célula progenitora intermedia; MA: manto; MZ: zona marginal; oiPC: célula progenitora intermedia de oligodendrocitos; niPC: célula progenitora intermedia neurogénica. (Kriegstein y Álvarez-Buylla 2009).

1.3 Neurogénesis adulta y sus nichos neurogénicos

El principal pionero del concepto de neurogénesis en el cerebro adulto fue Joseph Altman en la década de los 60, describiendo la posibilidad de existencia de nichos neurogénicos en rata y ratón (Altman y Das, 1965). La neurogénesis dirigida SVZ-OB fue descrita más tarde por Kaplan y Hinds (1977). Este concepto de que en el cerebro adulto existen poblaciones celulares con capacidad multipotente fue aceptado varias décadas atrás con la identificación de las NSCs presentes en el cerebro (Reynolds y Weiss, 1992).

La zona localizada donde se albergan las NSCs es conocido como nicho neurogénico. En el nicho neurogénico se genera un microambiente para que se desarrolle la neurogénesis endógena de manera adecuada. Los nichos neurogénicos del cerebro adulto son dos: la zona subventricular (SVZ) y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (GD) (Reznikov, 1991; Luskin, 1993; Lois y Álvarez-Buylla, 1994). A continuación, se detallan dichos nichos neurogénicos, haciendo especial énfasis en la SVZ sobre la que se basan los estudios de la presente tesis.

1.3.1 La Zona Subventricular (SVZ)

La composición celular del nicho neurogénico de la SVZ es compleja, no solo por la variedad celular sino también por la localización y las interacciones celulares que ejercen entre ellas (ver figura 15). A continuación se exponen los puntos más relevantes para definir la neurogénesis de la SVZ en el adulto.

1.3.1.1 Citoarquitectura y marcadores de identidad celular

El nicho neurogénico de la SVZ está formado por una serie de células que a continuación se detallan:

Células B

Las células B pueden dividirse en dos tipos en función de su localización y morfología, las células B1 y células B2.

Las **células B1** o NSCs, son unos astrocitos especiales que derivan de la glía radial durante el desarrollo. Solo un porcentaje muy bajo de células B1 están activamente proliferando, se estima que aproximadamente unas 700 células B1 proliferan al día en

Introducción

la SVZ adulta de ratón (Ponti et al., 2013). Las NSCs derivan en las células C con gran potencial proliferativo (ver figura 15). Las células B1 pueden identificarse por distintos marcadores como GLAST, BLBP, Connexin 30, GFAP, el filamento intermedio Nestina, el factor de crecimiento EGF (Epidermal Growth Factor) o el factor transcripcional SOX2 (ver figura 16) (Doetsch et al., 1999a; Pastrana et al., 2009; Nomura et al., 2010; Hartfuss et al., 2001). Las células B1 tienen multitud de receptores para factores de crecimientos como EGF o FGF-2 que intervienen en la regulación endógena de los fenómenos de neurogénesis (Doetsch et al., 2002; Jackson et al., 2006; Mudo et al., 2009). En cuanto a la morfología de las células B1, éstas presentan un núcleo poco denso y con la cromatina dispersa, su citoplasma presenta un contorno irregular y es rico en filamentos intermedios (Doetsch et al., 1997), y también presentan un pequeño extremo apical que contiene un cilio primario que no tiene motilidad y que siempre está en contacto con el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Doetsch et al., 1999b; Mirzadeh et al., 2008; Shen et al., 2008), permitiendo recibir señales reguladoras y mantener activos mecanismos sensoriales que intervienen en la regulación de procesos proliferativos de estas células por la interacción con moléculas y factores presentes en el LCR (Singla et al., 2006; Lim et al., 2000; Chenn y Walsh, 2002). También se ha relacionado la actividad del cilio primario de las células B1 con distintas señales mediadas por Shh, Wnt o PDGF (Corbit et al., 2005; Rohatgi et al., 2007). El proceso basal de las células B1, también permite el contacto con vasos sanguíneos (Mirzadeh et al., 2008) pudiendo así interactuar con las señales aportadas por el torrente circulatorio (Shingo et al., 2001; Kerever et al., 2007; Mirzadeh et al., 2008). Las células B1, se sitúan rodeando a los neuroblastos que migran de la SVZ formando pasillos o túneles que facilitan la migración de éstos (Lois et al., 1996; Doetsch et al., 1997; Mudo et al., 2009; Pastrana et al., 2009).

Células C

Son las células consideradas progenitores de rápida amplificación. Se generan a partir de la división asimétrica de las células B y generan las células A (ver figura 15). Presentan una tasa proliferativa superior al resto de células del nicho neurogénico, aproximadamente el 87% de las células C del cerebro adulto de ratón se encuentran dentro del ciclo celular (Doetsch et al., 1997; Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009; Ponti et

al., 2013) y se estima que las células C se dividirán tres veces antes de generar las células A (Ponti et al., 2013). Morfológicamente son células densas, lisas y su núcleo presenta visibles varios nucléolos y muchas invaginaciones (García-Verdugo et al., 1998). En su disposición en la SVZ se muestran agrupadas, en contacto con los neuroblastos que migrarán y con los vasos sanguíneos. Las células C presentan el marcador de ciclo celular Ki67, el receptor del factor de crecimiento EGF y los genes *Ascl1* y *Dlx2* (Doetsch et al., 1999a; Parras et al., 2004). *In vitro* pueden adquirir una capacidad multipotente al ser tratadas con EGF (Doetsch et al., 2002). Se ha observado como el factor de transcripción *Olig2* expresado en las células C dirige la diferenciación celular hacia el linaje oligodendroglial (Hack et al., 2005; Marshall et al., 2005).

Células A

Las células A, también conocidas como neuroblastos, se originan a partir de las células C. Son la población celular más abundante de la SVZ y derivarán principalmente en neuronas GABAérgicas que se incorporarán en el OB mediante la llamada RMS (*Rostral Migratory Stream*) (ver figura 17 y 18) (Lois y Álvarez-Buylla, 1994). Recientemente se ha descrito que un pequeño número de estos neuroblastos de la RMS pueden derivar hacia neuronas glutamatérgicas (Brill et al., 2009). Por otro lado, se ha observado que algunas células A pueden incorporarse al estriado (Ernst et al., 2014). La morfología característica de los neuroblastos de la SVZ es bipolar, con un núcleo muy grande y eucromático (Doetsch et al., 1997). Los marcadores característicos para esta población celular son DCX (Doublecortin), PSA-NCAM (PolySialylated-Neural Cell Adhesion Molecule) y β III-Tubulina (ver figura 15 y 16) (Seki et al., 1993; Francis et al., 1999; Yang et al., 2004). El 55% de los neuroblastos se divide al menos una vez en la SVZ adulta y tienen la característica de seguir proliferando durante el proceso migratorio (Doetsch et al., 1997; Wichterle et al., 1997; Peretto et al., 1999). Se estima que en el cerebro de ratón adulto se generan aproximadamente 10.000 células diarias y que son necesarios entre 3 y 4 días para la formación de células A a partir de las células B1 (Ponti et al., 2013).

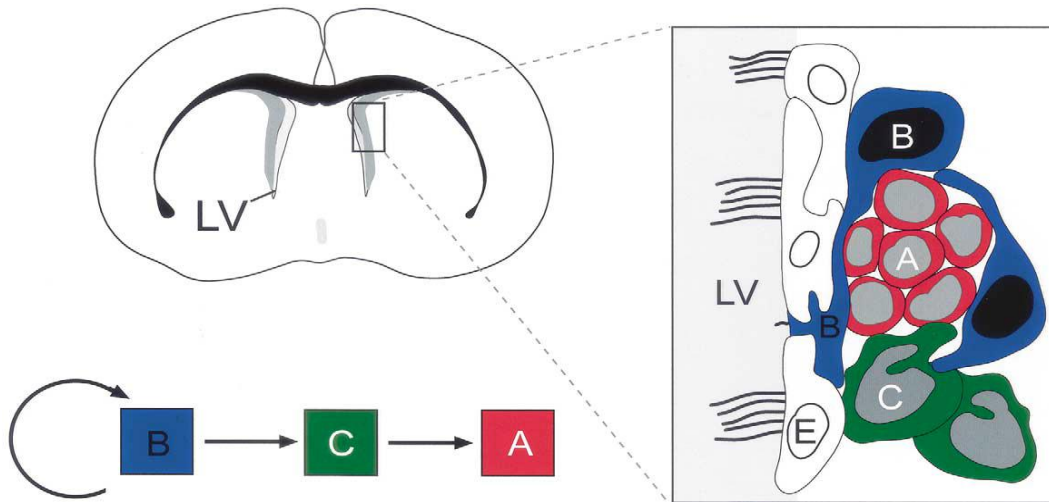


Figura 15. Corte coronal del cerebro donde se observa la región de la SVZ (izquierda) y un esquema de la composición celular y citoarquitectura de la SVZ (derecha). Los astrocitos de la SVZ, células B (azul), generan las células de C (verde) o progenitores de transición rápida que a su vez generan los neuroblastos o células A (rojo). Tapizando el LV se encuentran las células endodiales, células E (en blanco). Álvarez-Buylla et al., 2002.

Células E

Las células endodiales se encuentran tapizando el LV. Estudios de trazabilidad demostraron como las células endodiales provienen de la glía radial (Mirzadeh et al., 2010). Se clasifican en función del número de cilios que presentan: células endodiales multiciliadas (tipo E1), células endodiales biciliadas (tipo E2) (Mirzadeh et al., 2008). En cuanto a los marcadores que identifican esta población celular, éstas son positivas para los marcadores CD29, S100 β y la isolectina IB4 (Raponi et al., 2007; Mirzadeh et al., 2008; Pastrana et al., 2009). Las paredes del LV presentan una organización planar, donde los pequeños procesos apicales de las células B1 se encuentran internalizados en una estructura de roseta formada por las células endodiales (ver figura 17) (Mirzadeh et al., 2008). Esta organización permite que las NSCs establezcan uniones e interacciones entre ellas y con las células endodiales (Spassky et al., 2005; Sawamoto et al., 2006; Carlen et al., 2009).

Diversos estudios han demostrado como las células endodiales, del mismo modo que las células de la glía radial, presentan una polarización que corresponde con la dirección del flujo del LCR (Mirzadeh et al., 2010). En este sentido, se ha comprobado

Introducción

como la motilidad de ciliar de las células endodimales participa en el flujo del LCR, que afecta a la migración de los neuroblastos en la SVZ y RMS (Sawamoto et al., 2006)

En el interior del LCR existen multitud de componentes que interactúan con las células endodimales y las NSCs interviniendo en la proliferación y diferenciación de las NSCs. Las células endodimales pueden liberar factores que modulan la neurogénesis, como por ejemplo el Noggin, que inhibe la señalización de las BMPs favoreciendo la neurogénesis (Lim et al., 2000).

Como hemos mencionado anteriormente en condiciones fisiológicas se descartó la función de las células endodimales como las productoras de nuevas neuronas en el cerebro adulto sano (Doetsch et al., 1999a), aunque recientemente, se ha observado como la células endodimales son capaces de proliferar y generar nuevas neuronas ante lesión cerebral (Carlen et al., 2009).

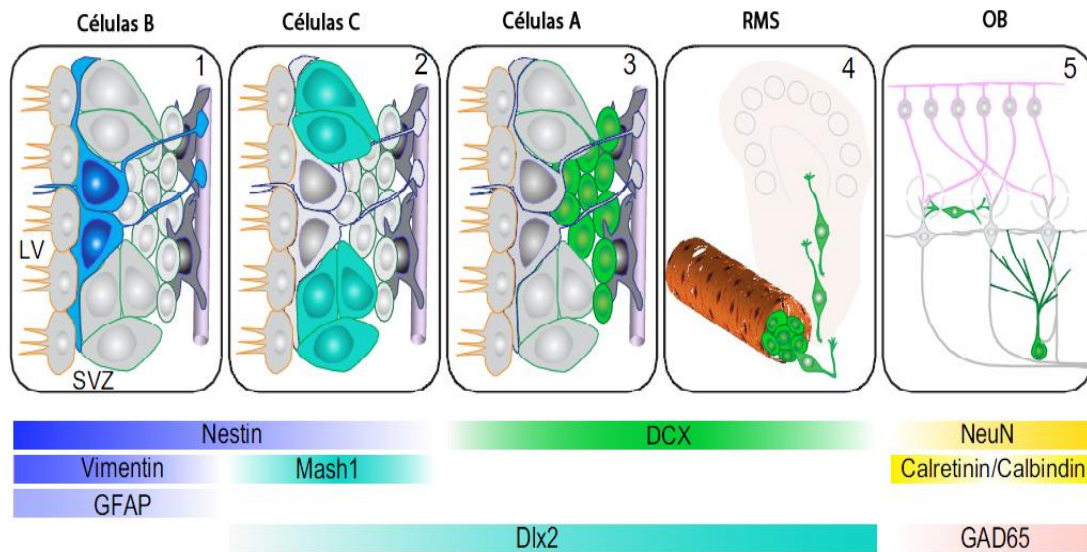


Figura 16. Marcadores representativos de los distintos tipos celulares en el proceso de neurogénesis.

Ming y Song, 2011.

Otros tipos celulares presente en el nicho neurogénico

Otros tipos celulares importante en el nicho neurogénico son la **microglía y las células epiteliales de la vasculatura** (ver figura 17). La función de la microglía en el proceso neurogénico está aún por definir, se conoce que la microglía en condiciones normales libera al medio sustancias como citocinas o sustancias tróficas que pueden regular el transcurso de la neurogénesis (Ekdahl et al., 2009; Thored et al., 2009). Por otro lado, las células B y C contactan directamente con los vasos sanguíneos (Palmer et al., 2000; Mirzadeh et al., 2008), los cuales aportan factores solubles que intervienen en los procesos de regulación y homeostasis de la neurogénesis, favoreciendo entre otras cosas, la proliferación celular (Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008). Por ejemplo, los vasos sanguíneos producen el factor de crecimiento endotelial VEGF (vascular endothelial growth factor) que contribuye a la regulación de las NSCs, incrementando su potencial proliferativo.

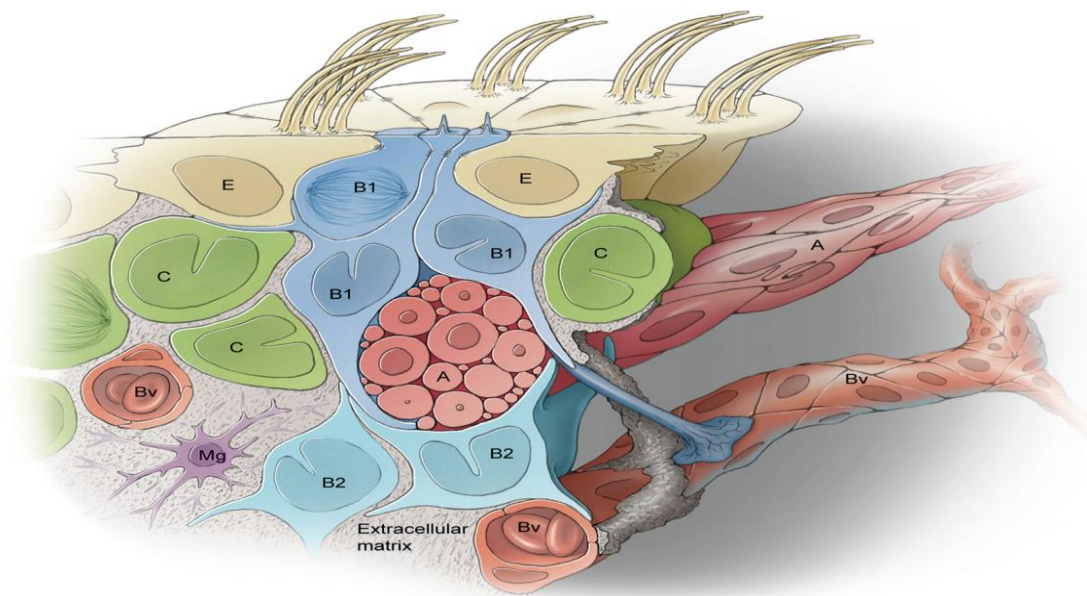


Figura 17. Representación de la citoarquitectura de la SVZ. En azul encontramos las células B1, dispuestas en forma de roseta alrededor de las células ependimales (E, en amarillo), con un proceso basal en contacto con los vasos sanguíneos (Bv) y un cilio corto en el interior del ventrículo. Las células B1 se encuentran envolviendo a los neuroblastos (A, en rojo) y en contacto con las células C (verde). En el nicho neurogénico también está presente la microglía (Mg, en morado). Las células B2 se encuentran más alejadas del ventrículo. Ihrie y Álvarez-Buylla, 2011.

1.3.1.2 Migración de los neuroblastos de la SVZ: RMS o rostral migratory stream

La migración que se da a través de la RMS es de las vías migratorias más largas y veloces del SNC (Nam et al., 2007). Para la migración de los neuroblastos a través de la RMS intervienen distintos tipos celulares esenciales en la migración, por un lado, los nuevos neuroblastos generados en la SVZ interactúan entre ellos formando una estructura en forma de cadenas o “clusters” crítica para la correcta migración de éstos (ver figura 18) (Lois et al., 1996; Zigova et al., 1998). Por otro lado, los astrocitos o células tipo B1 también forman parte de la RMS, formando estructuras tubulares alrededor de los neuroblastos migratorios (ver figura 18). Estas estructuras tubulares gliales son imprescindibles para la correcta migración de los neuroblastos a partir de estadios postnatales (Law et al., 1999). En este sentido, en ratones adultos se ha observado como los genes *Vax1* y *Bax*, expresados en los astrocitos, son fundamentales para la formación de estas estructuras gliales y la migración de neuroblastos, ya que su deficiencia provoca alteraciones en el flujo migratorio (Soria et al., 2004; Kim et al., 2007).

Otros tipos de células involucradas en la migración a través de la RMS son las células que conforman la vasculatura. Se ha observado como la vasculatura está dispuesta paralelamente al RMS, generando una interacción neuroblasto-astrocito-vasculatura (ver figura 18), en la que los vasos sanguíneos aportan moléculas endógenas capaces de regular esta vía de migración. Curiosamente, durante el desarrollo embrionario esta disposición, de los vasos sanguíneos, paralela al RMS no se ha observado, sugiriendo que solo es necesaria durante las fases postnatales y en el adulto (Snapyan et al., 2009; Whitman et al., 2009).

Dentro de la composición celular del RMS se han encontrado precursores neurales con capacidad multipotente capaces de generar *in vitro* (Pencea et al., 2001; Gritti et al., 2002; Liu et al., 2003), o en respuesta a daño cerebral, los tres linajes neurales, oligodendrocitos, neuronas y astrocitos (Gotts et al., 2005; Jablonska et al., 2010).

En cuanto a la regulación de la migración, está compuesta por múltiples señales de atracción-repulsión mediadas por las señales e interacciones célula-célula o con proteínas de la matriz extracelular (Coskun et al., 2002). A continuación, se mencionan una serie de moléculas involucradas en la regulación de la migración neuronal. La

Introducción

molécula PSA-NCAM, presente en los neuroblastos, es una molécula crítica en la regulación de la migración a través de la RMS. La eliminación de la parte PSA de la molécula provoca la disociación de los clusters o cadenas formadas por los neuroblastos, provocando fallos en la migración de éstos y observándose algunos de ellos que se dirigen hacia el cuerpo calloso o el estriado de manera inadecuada (Battista et al., 2010). La integrina $\alpha 6 \beta 1$ expresada en los neuroblastos de la RMS interactúa con las lamininas de la matriz extracelular para guiar la migración de una manera correcta, mientras que el bloqueo de esta integrina afecta negativamente a la migración de los neuroblastos a través de la RMS (Murase et al., 2002; Emsley et al., 2003). Los neuroblastos expresan la proteína Slit1, cuyo receptor, Robo, se expresa en los astrocitos que forman las estructuras tubulares gliales de la RMS. La asociación de Slit-Robo es fundamental para mantener la integridad de la RMS (Eom et al., 2010; Kaneko et al., 2010). Otros factores de crecimiento o neurotróficos como GDNF, VEGF o IGF-1 también están presentes en la regulación de la migración de los neuroblastos hacia su diana fisiológica (Russo et al., 2005; Paratcha et al., 2006; Wittko et al., 2009). Por último, mencionar como en estudios *in vivo*, donde se provoca la eliminación física del OB, sugieren que la migración a través de la RMS sigue activa, es decir, el OB no genera ninguna señal imprescindible en la ruta SVZ-RMS-OB y los nuevos neuroblastos se acumulan en el punto de lesión (Kirschenbaum et al., 1999). En estos resultados deben tenerse en cuenta que la eliminación del OB por métodos invasivos provoca una respuesta inflamatoria que podría afectar al comportamiento de los neuroblastos.

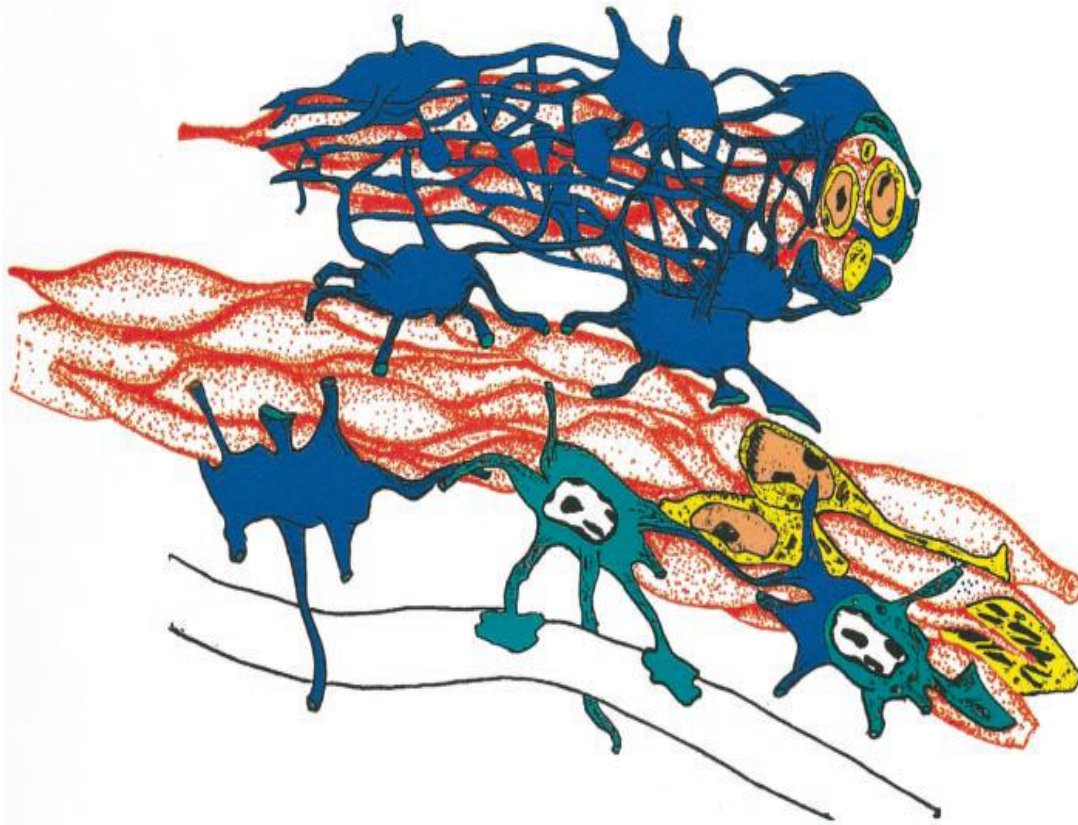


Figura 18. Esquema representativo de la RMS. Se observa la cadena de neuroblastos (en rojo), rodeada por una estructura glial formada por astrocitos (azul). Se observa como algunos astrocitos están en contacto con los vasos sanguíneos (blanco). También se representa la estructura intracelular de los neuroblastos (amarillo) y de los astrocitos (azul claro). Álvarez-Buylla y García Verdugo, 2002.

1.3.1.3 El OB como diana mayoritaria de los neuroblastos originados en la SVZ adulta

El OB de los roedores se encuentra en la región más dorsal del telencéfalo (Belluzzi et al., 2003) y como hemos mencionado anteriormente es la diana de las neuronas generadas en la SVZ. Histológicamente el OB está formado por una serie de capas concéntricas compuestas por células de distinta naturaleza. Las capas de exterior a interior son las siguientes: GL, capa glomerular; EPL, capa plexiforme externa; ML, capa mitral; IPL, capa plexiforme interna; GCL, capa granular (ver figura 19).

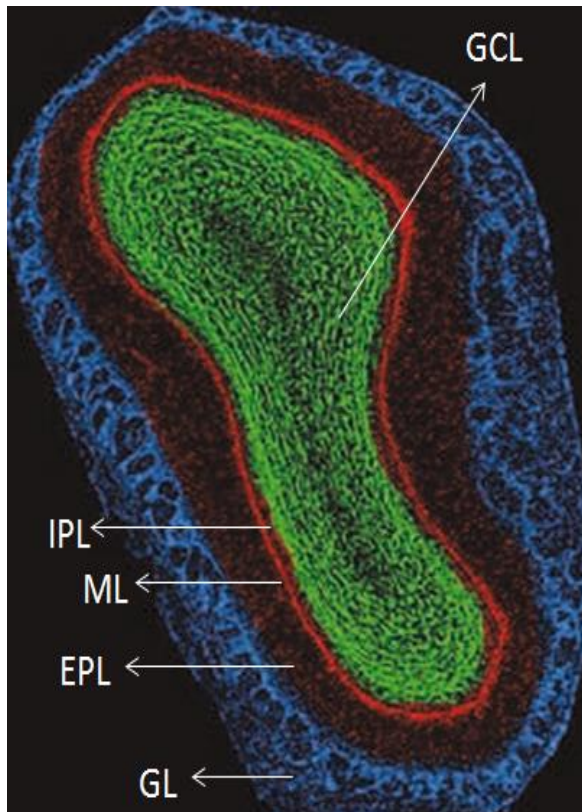


Figura 19. Sección coronal del OB de ratón donde se observan las capas celulares concéntricas. GL: Capa Glomerular; EPL: Capa Plexiforme Externa; ML: Capa Mitral; IPL: Capa Plexiforme Interna; GCL: Capa Granular. Zou et al., 2009.

La velocidad de producción de estas nuevas células generadas en la SVZ que llegan al OB es de 30.000-60.000 células/día (Lois et al., 1994; Peterson et al., 1999); estudios de trazabilidad celular determinaron como las células generadas en la SVZ tardan aproximadamente una semana en alcanzar el OB (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002), sin embargo, deben transcurrir entre 15-30 días para que se conviertan en interneuronas maduras en éste (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002; Belluzzi et al., 2003). Hay que incidir que un porcentaje importante de los neuroblastos, que llegan al OB no se integrarán correctamente, observándose en ellos la activación de procesos de muerte celular programada (apoptosis) (Petreanu y Álvarez Buylla, 2002; Mouret et al., 2009). No obstante, se sugiere que la demanda neuronal y apoptótica debe estar regulada para la correcta plasticidad celular en el OB (Buss et al., 2006).

El tipo de interneuronas GABAérgicas que se generan a partir de las neuroblastos de la SVZ son dos: (I) las interneuronas granulares, que representan el 75-80 % de las interneuronas que se generan de las NSCs de la SVZ, son de naturaleza GABAérgica y se localizan en la capa granular del OB (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002; Carleton et al., 2003), a su vez, estas interneuronas pueden clasificarse en función de su profundidad en el OB, existiendo interneuronas granulares profundas e interneuronas granulares

Introducción

superficiales. (II) las interneuronas periglomerulares, que proporcionalmente son minoritarias comparándolas con las granulares, son muy heterogéneas ya que pueden dividirse en subpoblaciones distintas atendiendo a características neuroquímicas, así podemos encontrarnos con interneuronas Calretinina positivas (Cr), interneuronas Calbindina positivas (Cb), o interneuronas dopaminérgicas Tirosina hidroxilasa positivas (TH) (Hack et al., 2005; Kohwi et al., 2007). Las subpoblaciones de interneuronas periglomerulares tienen distintas funciones en cuanto a la regulación de las señales recibidas.

La localización de las NSCs en la SVZ determinará las distintas poblaciones de interneuronas en el OB (Merkle et al., 2007), es decir, la regionalización de las NSCs en su nicho neurogénico determina el fenotipo celular final de los distintos subtipos de interneuronas. Se ha observado como la especificación celular está determinada por factores genéticos y no dependen de su entorno, ya que se han realizado estudios en los que se han trasplantados NSCs de una región concreta de la SVZ en otra región distinta y dichas células se diferencian atendiendo a su origen y no al entorno final en el que se trasplantaron (ver figura I10) (Petreanu y Álvarez Buyla, 2002; Merkle et al., 2007). De este modo se ha observado como las NSCs de la SVZ dorsal generan principalmente interneuronas granulares superficiales, aunque también se generan en bajo porcentaje interneuronas periglomerulares dopaminérgicas. Por otro lado las NSCs de la SVZ ventral, generan principalmente interneuronas granulares profundas y también interneuronas periglomerulares Cb+ (Hack et al., 2005). Por último, los progenitores de la región anterior del ventrículo y RMS se diferencian principalmente en interneuronas periglomerulares, preferentemente del tipo Cr+, y en menor medida en interneuronas granulares (Ver figura I8; Kohwi et al., 2005, 2007; Kosaka et al., 2007).

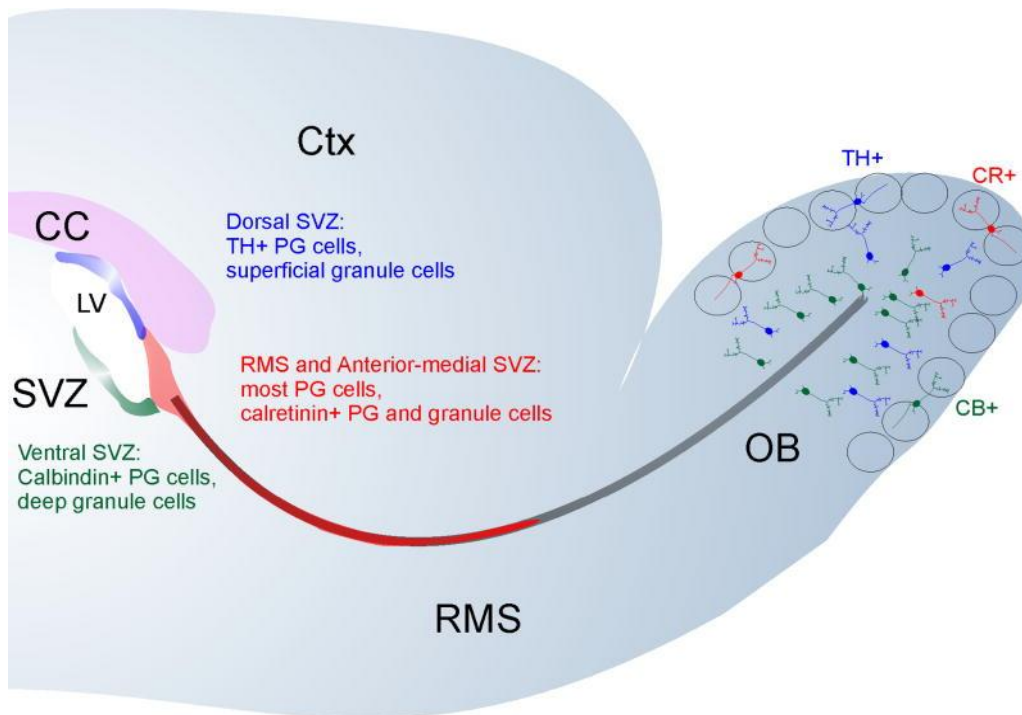


Figura I10. Fenotipo de las interneuronas generadas. Dibujo de sección sagital de cerebro donde podemos observar la SVZ, el RMS y el OB. La localización de las NSCs, determinará el fenotipo de las neuronas maduras generadas. La SVZ dorsal genera mayoritariamente células granulares superficiales y periglomerulares tirosina hidroxilasa+; la SVZ ventral genera principalmente células células granulares profundas y periglomerulares Calbindina+; RMS genera mayoritariamente células periglomerulares Calretinina+ y células granulares. OB: bulbo olfatorio; RMS: rostral migratory stream; Ctx: corteza; SVZ: zona subventricular; LV: ventrículo lateral; CC: cuerpo calloso; TH+: tirosina hidroxilasa; CR: calretinina; CB: calbindina; PG: periglomerulares (Whitman y Greer 2009).

Por otro lado, se ha observado cierto *patterning* de expresión de genes, entre ellos distintos factores de transcripción que se expresan mayormente en subregiones concretas de la SVZ y que podrían intervenir y modular en la generación de fenotipos de interneuronas específicos (Lledó et al., 2008; Merkle et al., 2013).

1.3.1.4 Oligodendrogénesis

Como se ha descrito anteriormente, las NSCs de la SVZ tienen características multipotentes y a pesar de que en situaciones normales se diferencian mayormente hacia el linaje neuronal, también tiene lugar una cierta diferenciación oligodendroglial y producir oligodendrocitos mielinizantes que migran hacia la sustancia blanca, cuerpo calloso o estriado (Doetsch, 2003b; Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009; Menn et al., 2006). La oligodendrogénesis en la SVZ parece que está regulada principalmente por el factor de transcripción Olig2, el cual al expresarse en las células C promoviendo su diferenciación glial hacia nuevos OPC (Precusores de Oligodendrocitos). Además, el factor de transcripción Olig2 regula negativamente los factores de transcripción Dlx, que intervienen en la diferenciación neuronal (Petryniak et al., 2007). En enfermedades desmielinizantes se ha observado que se estimula la expresión de Olig2 incrementando sustancialmente la cantidad de OPC generados por parte de la SVZ con el fin de incrementar la población madura de oligodendrocitos mielinizantes (González-Pérez y Álvarez Buylla, 2011). Existen factores que regulan la síntesis de oligodendrocitos, un modulador importante es el EGF (Epidermal Growth Factor), el cual incrementa la proliferación de las células B1 y C de la SVZ, provocando a su vez un incremento de las células Olig2+, Nestina+ y NG2+ en la SVZ (Doetsch et al., 2002), este efecto parece que está mediado por las vías de señalización de Notch y EGFR (Aguirre et al., 2007). Otras moléculas que regulan la oligodendrogénesis son Noggin, que liberado por las células ependimales de la SVZ favorece la diferenciación oligodendroglial (Cate et al., 2010), o la proteína endothelin-1 que incrementa la migración y diferenciación de los OPC hacia oligodendrocitos maduros (Gadea et al., 2009). Por otro lado, un estudio reciente demuestra como en modelos de lesión cerebral el tratamiento con EPO (eritropoyetina) promueve la diferenciación celular hacia OPC y finalmente se originan oligodendrocitos maduros con el fin de restaurar y mielinizar la región afectada (Kaneko et al., 2013).

Un estudio reciente muestra como en ratones de 24 meses de edad, la RMS se encuentra desorganizada desde el punto de vista estructural y la incorporación de nuevas neuronas en el OB se ve disminuida; en conclusión la edad reduce la neurogénesis endógena de la SVZ. Sorprendentemente, la población oligodendroglial

de estos ratones viejos se mantiene igual respecto a la población oligodendroglial de ratones jóvenes (Capilla-González et al., 2013).

1.3.2 Giro dentado del Hipocampo (GD)

El otro nicho neurogénico presente en el cerebro adulto es el de la zona subgranular del giro dentado (GD) del hipocampo. A continuación se expondrán las características más relevantes de la neurogénesis en este nicho sin profundizar en detalle, ya que no ha sido objeto de estudio de la presente tesis.

En el GD del hipocampo también encontramos NSCs con capacidad multipotente y de auto-renovación (Bonaguidi et al., 2011; Mu y Gage, 2011). Si bien, este nicho neurogénico presente diferencias significativas con la SVZ. Por ejemplo, en el GD del hipocampo encontramos dos tipos de NSCs, las NSCs tipo1 y las tipo 2. Las tipo 1 morfológicamente presentan un proceso radial que entra en la capa granular y se ramifica en el interior de dicha capa (ver figura I11). Los marcadores representativos de esta población celular son GFAP, SOX2 y Nestina. Las células tipo 2 provienen de las tipo 1, se ha sugerido que las células tipo 1 son NSCs en un estado quiescente que cuando se activan generan las tipo 2, las cuales son consideradas como progenitores intermedios. En cuanto a los marcadores celulares de las NSCs tipo 2, éstas son positivas para SOX2 y Nestina, pero no para GFAP. Dichos progenitores intermedios tienen la capacidad de generar neuroblastos (DCX+) que principalmente se diferenciarán en neuronas células granulares glutamatérgicas, que físicamente se integran en la capa CA3 del hipocampo (Mu y Gage, 2011) (ver figura I11).

Se estima que aproximadamente 9.000 nuevas neuronas se generan en el GD del hipocampo, de las cuales únicamente se integrarán funcionalmente el 50% (Cameron et al., 2001). Las dendritas de las células que se integran en la capa granular del hipocampo interaccionan con las neuronas piramidales de la capa CA3 del hipocampo, y a su vez, reciben continuamente señales glutamatérgicas del cortex cerebral (Mu y Gage, 2011) (ver figura I11). Del mismo modo que en la SVZ, en el GD del hipocampo existen multitud de factores intrínseco y extrínsecos capaces de regular el proceso neurogénico. Así pues, morfógenos, citocinas, neurotrofinas u hormonas intervienen en dicha regulación a la que se le suma la regulación epigenética.

Introducción

En cuanto a la implicación funcional que tienen las nuevas neuronas generadas e integradas en el hipocampo adulto, se sugiere que la neurogénesis del GD del hipocampo está relacionada con las funciones de aprendizaje y memoria (Squire et al., 1992; Deng et al., 2010). En este sentido, en modelos animales sometidos a irradiación cerebral se ha podido correlacionar la reducción en la neurogénesis hipocampal con una disminución del aprendizaje y la memoria (Squire et al., 1992; Deng et al., 2010).

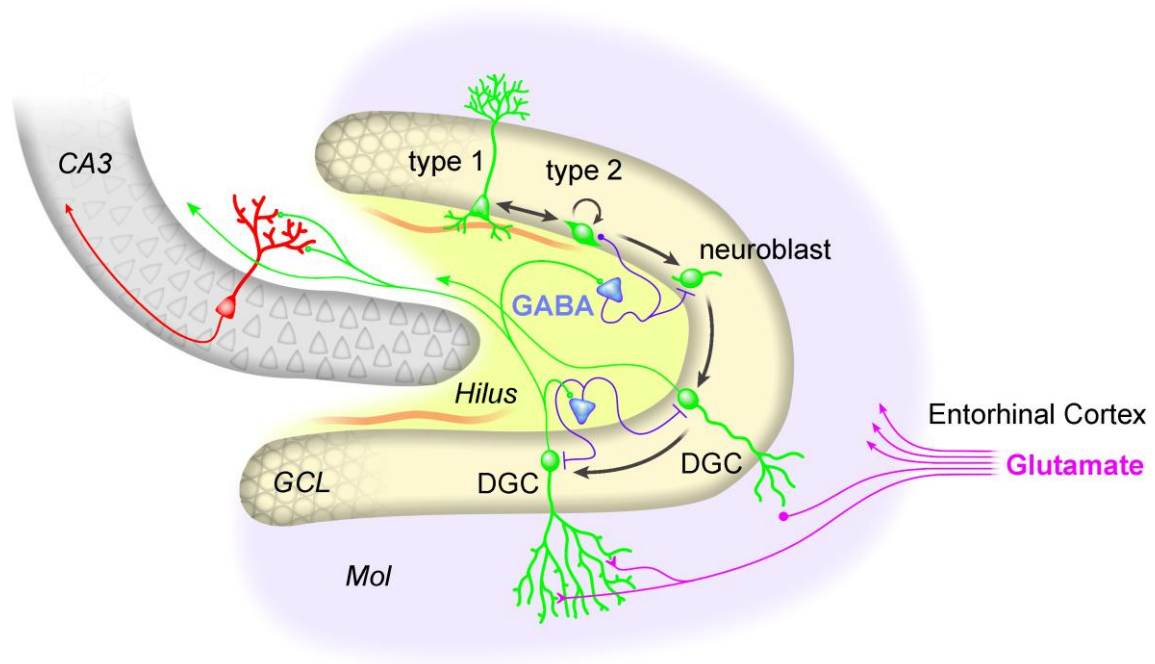


Figura I11. Representación esquemática de la neurogénesis del GD del hipocampo. Como puede observarse en la imagen las NSCs tipo 1 morfológicamente son distintas a las NSCs tipo 2 o progenitores intermedios. Las NSCs tipo 1 presentan un proceso radial que atraviesa la capa glomerular (GCL) y se ramifica. Las NSCs tipo 2 generan los neuroblastos, los cuales migran distancias cortas hasta integrarse en la GCL y madurar en neuronas DGC. En la figura se puede observar como las neuronas DGC reciben estímulos glutamatergicos del "Entorhinal Cortex" y se comunican con las neuronas piramidales presentes en la capa CA3 del hipocampo. También puede observarse como estímulos GABAérgicos interaccionan continuamente con las NSCs tipo2, neuroblastos y neuronas DGC (Mu y Gage, 2011).

2. MECANISMOS QUE REGULAN LA NEUROGÉNESIS

2.1 Moléculas endógenas implicadas en la regulación de la neurogénesis

2.1.1 Sonic Hedghog (Shh)

Shh es el miembro de la familia Hedgehog más estudiado y conocido por su papel en el desarrollo del SN. La secreción del Shh por el notocordio y la placa ventral genera un gradiente de expresión que será muy relevante para la adquisición de la identidad celular y la especificación neuronal en la parte ventral del tubo neural (Ruiz et al., 2002; Jiang y Hui, 2008). Además, durante el desarrollo del cerebro, Shh también regula la proliferación, diferenciación y supervivencia de los progenitores neurales (Lai et al., 2003; Palma et al., 2004).

En el cerebro adulto, la implicación de Shh en la neurogénesis ha sido ampliamente estudiada, así pues, se ha observado como la inhibición de la vía de señalización de Shh con ciclopamina o el bloqueo específico de la acción de Shh con anticuerpos anti-Shh provoca una disminución de sus componentes principales Gli1, Ptch1, SOD1 (Ji et al., 2012) y una reducción en la proliferación de las NSCs en la SVZ del cerebro adulto. También se ha observado como en ratones deficientes para Shh hay una reducción en el número de progenitores neurales tanto en la SVZ como en el GD (Machold et al., 2003; Balordi et., al 2007). Asimismo, en ratones deficientes para el gen Smo, implicado en la vía de señalización de Shh, se observa una disminución de la neurogénesis y en el tamaño del hipocampo en estos animales (Young et., al 2007).

Por otro lado, se ha sugerido que Shh tiene un papel quimioattractor regulando la migración de los neuroblastos generados en la SVZ adulta a lo largo de RMS hasta el OB (Hor, 2010). En este sentido, estudios *in vivo* revelan como al inyectar Shh intracerebralmente se incrementa el número de células PSA-NCAM positivas en la RMS

Introducción

y los niveles de moléculas de adhesión como β -Integrina y N-Cadherina, demostrando su implicación con la migración celular del eje SVZ-RMS-OB (Machold et al., 2003; Balordi et al., 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, la posición de las NSCs en la SVZ determinará el tipo de progenie que se dará tras la diferenciación celular de las NSCs (Kohwi et al 2007; Merkle et al 2007; Young et al 2007). Recientemente, la actividad de Shh ha estado relacionada con esta determinación posicional (Ihrie et al., 2011). Shh actúa principalmente en la SVZ ventral favoreciendo la diferenciación a interneuronas granulares profundas en el OB, mientras que las células de la SVZ dorsal son menos sensibles al estímulo Shh lo que provocará la generación de interneuronas granulares superficiales en el OB (Ihrie et al., 2011).

Shh juega un papel importante en enfermedades neurodegenerativas como la isquemia cerebral. En modelos *in vivo* e *in vitro* de isquemia/hipoxia se ha observado un incremento de los niveles de Shh que parecen favorecer la proliferación celular de los precursores neurales (Sims et al., 2009). A su vez, en lesiones isquémica, Shh incrementa los niveles de angiotenina-1, principalmente en astrocitos, que actúan sobre las células endoteliales de la microvasculatura cerebral y podrían mejorar y reparando los daños generados sobre la barrera hematoencefálica (BHE) (Xia et al., 2013). Por otro lado, el empleo de inhibidores de la vía de señalización de Shh, como la ciclopamina, en modelos *in vitro* e *in vivo* de isquemia/hipoxia provoca efectos negativos sobre la proliferación de los precursores neurales e incrementa el volumen de infarto, poniendo de manifiesto la importancia del papel de Shh en patologías como la isquemia cerebral (Sims et al., 2009). También se ha demostrado como uno de los tratamientos clínicos empleados en esta patología, cerebrolysin, actúa a través de la señalización de Shh provocando un incremento de la proliferación celular y de la diferenciación neuronal y oligodendroglial (Zhang et al., 2013). Esta relación ha sido observada *in vivo* al tratar animales isquémicos con cerebrolysin y el inhibidor de la vía de señalización Shh ciclopamina, observando como los efectos beneficiosos del cerebrolysin son atenuados por el tratamiento conjunto con el inhibidor (Zhang et al., 2013). Todos estos resultados ponen de manifiesto el posible efecto protector de Shh ante episodios hipóxicos/isquémicos.

2.1.2 Notch

La vía de señalización de Notch se da por contacto célula-célula, los receptores de Notch son heterodímeros transmembrana que se unen a ligandos situados en la membrana de las células adyacentes, generando en el citosol celular la formación de NICD (Notch Intracellular Domain), el cual se trasloca al núcleo donde interactúa con factores de transcripción como RBPj y potencia la expresión de factores Hes (Bray et al., 2010). Se ha observado como los componentes de la vía de señalización de Notch están expresados en los nichos neurogénicos SVZ y GD (Imayoshi et al., 2010).

La señalización de Notch está involucrada en múltiples procesos del desarrollo embrionario del SN (Yoon et al., 2005). Es una de las vías de señalización de mayor importancia en el mantenimiento de las NSCs en los estadios adultos y embrionarios, ya que actúa promoviendo la salida del ciclo celular de estas células y permite el mantenimiento de su estado indiferenciado (Hitoshi et al., 2002). El papel de Notch en el mantenimiento de las NSCs está apoyado por estudios sobre ratones deficientes en la proteína RBPj, factor de transcripción que controla la expresión de Hes, donde se observa una reducción del número de NSCs tanto en estadios adultos como embrionarios (Imayoshi et al., 2010). Un trabajo reciente (Giachino et al., 2014) determina que las NSCs expresan el factor de transcripción Hes5, dependiente de la vía de señalización de Notch. En este trabajo se clasifican las células B1 en tres subtipos atendiendo a características neuroquímicas y funcionales. Así, sugieren como las células B tipo 1 son las que expresan el factor de transcripción Hes5 y el marcador astrogial GFAP, son mitóticamente inactivas (quiescentes) e incrementan con la edad, reduciendo la neurogénesis. Las células B1 tipo 2 son aquellas Hes5+/GFAP+/BLBP+ y generan las células B1 tipo 3 Hes5+/BLBP+, encargadas de generar las células tipo C que proliferarán y diferenciarán hacia neuroblasto (ver figura I12).

Estudios del grupo de Isabel Fariñas (Ramírez-Castillejo et al., 2006; Andreu-Agulló et al., 2009) demostraron como el balance entre las divisiones asimétricas y simétricas de las NSCs puede ser regulado endógenamente por el efecto que ejerce PEDF (Pigment Epithelium Derived Factor), presente en los vasos sanguíneos y microvasculatura del nicho neurogénico, sobre la vía de señalización de Notch, incrementando la expresión de los factores de transcripción Hes1 y Hes5 que potencian la auto-renovación y el mantenimiento de la multipotencia de las NSCs. Poniendo de manifiesto como las

Introducción

NSCs de la SVZ pueden ser moduladas por factores extrínsecos y por el propio microambiente del nicho neurogénico, incluso por factores derivados de la vasculatura del nicho como el PEDF (Andreu-Agulló et al., 2009).

De manera parecida, en el hipocampo Notch también muestra funciones necesarias para el mantenimiento y auto-renovación de las NSCs, de este modo, se ha observado como la inactivación del factor de transcripción RBPj provoca una reducción drástica en la neurogénesis hipocampal (Ehm et al., 2010) y como la sobreexpresión NICD provoca un incremento en la proliferación de las NSCs en el hipocampo (Breunig et al., 2007).

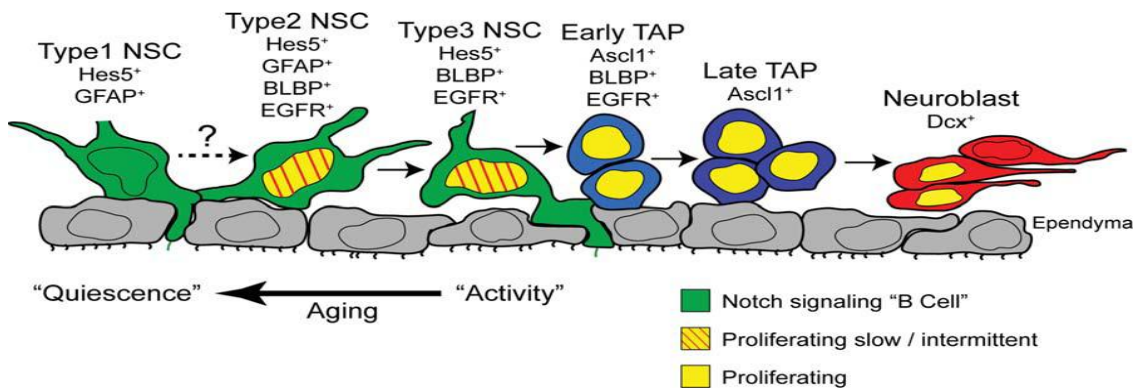


Figura I12. Las NSCs son dependientes de la vía de señalización de Notch y expresan el gen Hes5 (Células en verde). En este modelo se subdividen a las NSCs atendiendo a las características neuroquímicas y funcionales. Las NSCs Tipo 1 son células GFAP⁺/Hes5⁺, la de tipo 2 son células GFAP⁺/Hes5⁺/BLBP⁺ y las de tipo 3 son células Hes5⁺/BLBP⁺. Los tres tipos de células B1 descritos muestran las mismas características morfológicas y están en contacto con el interior del ventrículo. Atendiendo a características funcionales, las células B tipo 1 son aquellas que se encuentran en estado quiescente, es decir, mitóticamente inactivas. Las células tipo 2 generarán las de tipo 3 que son las NSCs activadas. Con la edad se ha observado un incremento de células tipo 1 y una disminución de las células tipo 3 relacionada con la bajada en la neurogénesis. Las células tipo 2 y tipo 3 formarán las células C (Azul), que se subdividen en dos poblaciones en función de la expresión o no de BLBP, las BLBP⁺ serán las células C tempranas y las BLBP⁻ serán las células C tardías que generarán los neuroblastos (Rojo). Giachino et al., 2014.

2.1.3 Wnt

La vía de señalización Wnt es una de las vías de señalización más conservadas, los ligandos de la vía de señalización Wnt son una familia de glicoproteínas secretadas de forma autocrina o paracrina implicados en múltiples procesos de gran relevancia como el correcto desarrollo del SN en estadios embrionarios. La inactivación o alteración de esta vía de señalización se relaciona con alteraciones en el SNC como esquizofrenia, autismo o la enfermedad de Alzheimer (De Ferrari et al., 2006).

La vía de señalización Wnt también actúa sobre la neurogénesis de los nichos neurogénicos adultos, en este sentido, se ha observado como las NSCs hipocampales expuestas a ligandos de Wnt promueven la proliferación y diferenciación neural, y como la sobreexpresión de Wnt3A y Wnt5A promueve la proliferación y la diferenciación neural en la SVZ adulta (Yu et al., 2006). Estas observaciones son contrastadas con estudios en los que al bloquear la vía de señalización Wnt se observa una reducción en la neurogénesis (Lie et al., 2005).

2.1.4 Bone Morphogenic Proteins

Los Bone Morphogenic Proteins (BMPs) son una familia de moléculas compuesta por más de 30 ligandos. BMP2 y BMP4 son los ligandos más importantes en vertebrados, adquiriendo un papel importante en el desarrollo del SN (Mehler et al., 1997; De Robertis et al., 2004) (ver figura I13). La actuación de los BMPs depende del estadio de la vida en el que se encuentren, en este sentido, se ha observado como en las fases iniciales del desarrollo es necesaria la actuación de BMPs para la formación de ectodermo NO-neural y posteriormente la inhibición de la señal de BMPs es necesaria para la formación del neuroectodermo (Kuroda et al., 2004), también se ha observado como durante el desarrollo embrionario actúan induciendo la diferenciación neural de la corteza cerebral (Li et al., 1998) o inhibiendo la neurogénesis del epitelio olfativo embrionario (Shou et al., 1999). A su vez, estudios durante el desarrollo embrionario determinaron como distintos tiempos de exposición de BMPs generan distintos niveles de señalización intracelular, que a su vez genera distintos subtipos de neuronas dorsales (Tozer et al., 2013).

Del mismo modo que la activación de BMPs es necesaria durante el desarrollo, su inhibición es igual de importante para otros mecanismos. Existen más de 20 ligandos

Introducción

endógenos capaces de inhibir la respuesta de BMPs. Noggin es un polipéptido endógeno que se une a BMPs inhibiendo el efecto de éstos (Zimmerman et al., 1996). En el estadio de gástrula se ha observado como Noggin es excretada para provocar la inhibición de BMPs e inducir la aparición del neuroectodermo (Lamb et al., 1993). Sin embargo en el embrión de ratón Noggin no es necesario para la inducción de la placa neural pero sí será esencial en el posterior desarrollo del tubo neural (McMahon et al., 1998). De este modo los ratones deficientes en Noggin presentan defectos en el desarrollo embrionario (Bachiller et al., 2000).

En la SVZ adulta se ha observado expresión de BMPs y de sus receptores (BMP_R), mientras que la expresión de Noggin se localiza en las células endodiales de la SVZ (Gross et al., 1996; Lim et al., 2000). En el adulto se ha observado como la sobreexpresión de BMP *in vivo* provoca la inhibición de la proliferación de las NSCs y sus progenitores y a su vez, favorece la diferenciación hacia el fenotipo glial (Lim et al., 2000). Sin embargo, en el cerebro adulto la liberación de Noggin por las células endodiales es lo que permite que en condiciones fisiológicas haya un bloqueo del efecto antineurogénico de los BMPs.

La actividad de los BMPs ante una lesión del SNC está también descrita, en esta línea, se ha observado como BMP2 actúa en situaciones de daño por trauma en médula espinal incrementando la astrogliosis (Cheng et al., 2007), como BMP4 se sobreexpresa en la patología de EAE (Encefalitis Autoinmune Experimental) mediando la respuesta inflamatoria (Ara et al., 2008) y como BMP7 se sobreexpresa en modelos animales de isquemia cerebral jugando un papel en la neurogeneración del tejido isquémico (Chang et al., 2003).

Introducción

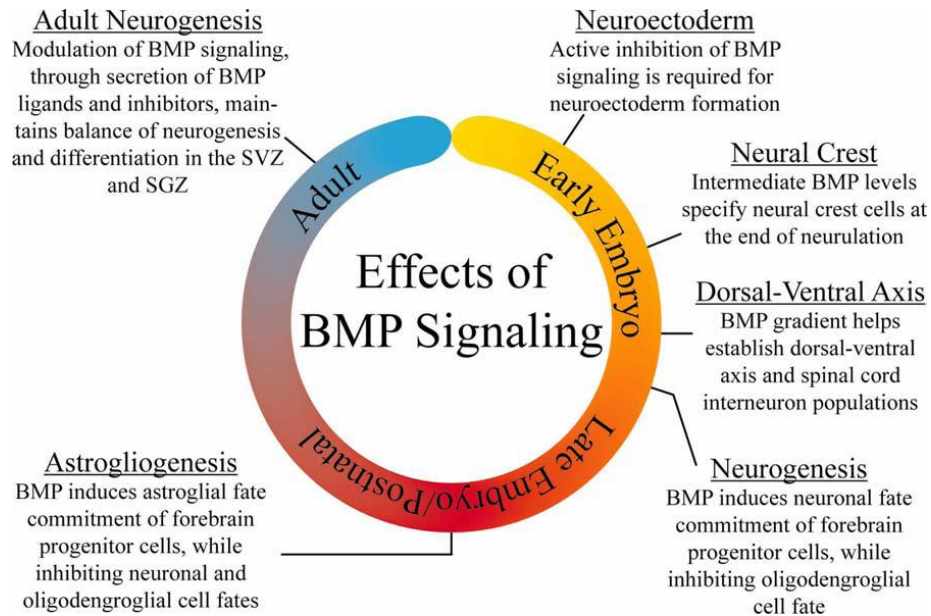


Figura I13. Funciones de la señalización de BMP. Durante el inicio del desarrollo embrionario se inhibe su señalización para la formación del neuroectodermo. Un gradiente de señalización de BMP genera el eje dorsoventral y la cresta neural. En el estadio embrionario tardío la señalización de BMP promueve la neurogénesis e inhibe la oligodendrogénesis. En el desarrollo postnatal la señalización de BMP induce la inhibición de los linajes neurales y oligodendrogiales, mientras que favorece la astroglíogenesis. En la edad adulta debe existir un balance en la señalización de BMP para el mantenimiento de la neurogénesis en los nichos neurogénicos (Bond et al., 2012).

2.1.5 Neurotrofinas

Las neurotrofinas generalmente son conocidas por sus funciones ante la supervivencia neuronal y por modular la plasticidad cerebral (Chao et al., 2003). **BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)** es el miembro de la familia de las neurotrofinas más estudiado. Su actividad afecta a la supervivencia neuronal durante el desarrollo y en la edad adulta (Barde et al., 1982; Johnson et al., 1986; Friedman et al., 1993). Su acción es mediada por el receptor TrkB (Klein et al., 1991) y también por el receptor p75 (Barker et al., 2004) y se ha observado como tanto BDNF como sus receptores, TrkB y p75, se expresan en los nichos neurogénicos adultos (Wetmore et al., 1990).

Se han generado distintas controversias sobre la acción de BDNF en el cerebro adulto. Así pues, se ha descrito como BDNF incrementa la producción de nuevas neuronas en el OB (Pencea et al., 2001), sin embargo, otros grupos de investigación han observado como el tratamiento ICV con BDNF no provoca un incremento en la neurogénesis de la SVZ de ratón, mientras que los mismos estudios en rata demuestran como hay una reducción de la neurogénesis (Galvao et al., 2008). También se ha generado

Introducción

controversia por la naturaleza celular en la que se expresa TrkB, el receptor específico para BDNF, algunos grupos observaron como el receptor TrkB se expresaba en neuroblastos y no en astrocitos (Chiaramello et al., 2007; Bath et al., 2008), y por otro lado, en otros estudios se ha descrito como el receptor TrkB se expresa en las células endodiales y astrocitos de la SVZ pero no en neuroblastos (Galvao et al., 2008).

En animales deficientes para BDNF se ha observado una reducción en la integración de nuevas neuronas en el OB (Bath et al., 2008) apoyando el papel de neurotrofina necesaria para la neurogénesis en estado fisiológico. Sin embargo, este déficit en la integración neuronal del OB no es observado hasta las dos semanas de vida, apoyando la idea de que la actividad de BDNF depende del estadio del desarrollo en el que se encuentre.

En modelos animales de neurodegeneración se ha observado como BDNF tiene efectos neuroprotectores y ayuda en los procesos de reparación del daño sináptico generado (Nagahara et al., 2011), por ejemplo, se ha observado como tras un proceso isquémico BDNF potencia la generación vascular y la migración de neuroblastos hacia el tejido infartado (Grade et al., 2013).

Aunque BDNF sea la neurotrofina más estudiada, existen otras neurotrofinas que juegan un papel importante en la neurogénesis. La neurotrofina NGF (Nerve Growth Factor), se ha observado que potencia la proliferación celular en la SVZ de cerebro adulto tras su administración (Fiore et al., 2002), y en modelos animales de EAE se observa como su administración provoca un incremento en la proliferación celular (Triaca et al., 2005).

La neurotrofina 3 (NT-3) también está implicada en la proliferación celular de la SVZ adulta, observándose como en animales deficientes para esta neurotrofina se reduce la proliferación celular en la SVZ (Kahn et al., 1999).

2.1.6 Otros factores de crecimiento

Aparte de los factores citados anteriormente pasaremos a mencionar otras moléculas con acciones muy relevantes en la biología del SVZ como nicho neurogénico. Entre ellos un factor de crecimiento implicado en la regulación neurogénica es FGF-2 (Fibroblast Growth Factor), este factor de crecimiento se expresa en las células GFAP+

Introducción

de la SVZ (González et al., 1995; Mudo et al., 2007) y provoca el incremento de la neurogénesis tras su administración ICV (Kuhn et al., 1997).

El factor de crecimiento EGF (Epidermal Growth Factor), como se ha comentado en apartados anteriores, también incrementa la proliferación celular en la SVZ tras su administración ICV (Okano et al., 1996). Recientemente se ha observado como dicho incremento en la proliferación celular, provocado por EGF, dirige la diferenciación celular de los progenitores de la SVZ hacia un linaje oligodendroglial (González-Pérez et al., 2009). Estos resultados son apoyados en los estudios de Aguirre y Gallo (2007) al bloquear el receptor de EGF en un modelo de lesión cerebral en animales, observando una disminución de la migración de las células generadas en la SVZ y una disminución en la oligodendrogénesis (Aguirre y Gallo, 2007).

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), tras la administración ICV de este factor de crecimiento se observa un incremento en la proliferación celular de la SVZ (Sun et al., 2006), y en modelos animales de lesión cerebral se observa como el tratamiento con este factor de crecimiento provoca un incremento en la migración de las nuevas células generadas en la SVZ hacia el tejido dañado (Wang et al., 2007b).

TGF (Transforming Growth Factor), también juega un papel importante en la neurogénesis endógena. Se ha observado como la administración ICV de este factor de crecimiento provoca un incremento de la proliferación celular de la SVZ (Craig et al., 1996). Además, en animales *knockout* para esta molécula se observa una reducción de la proliferación celular en la SVZ y de la integración de nuevas neuronas en el OB (Tropepe et al., 1997). Por otro lado, se ha observado como la administración TGF- β 1 tras un proceso de isquemia cerebral provoca el incremento de la neurogénesis y puede atenuar el daño producido por la isquemia cerebral (Ma et al., 2008).

CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor), es un factor de crecimiento exclusivo del SNC que se expresa predominantemente en astrocitos (Dallner et al., 2002). La administración ICV de CNTF provoca un incremento en la proliferación de la SVZ, mientras que el bloqueo de CNTF mediante anticuerpos anti-CNTF provoca una disminución de la proliferación celular (Emsley y Hagg et al., 2003). Estas observaciones son corroboradas al observar en animales *knockout* para CNTF una reducción del 20% en la proliferación celular de la SVZ (Yang et al., 2008).

2.1.7 La vía de señalización JAK-STAT

JAK-STAT es el nombre de una vía de señalización intracelular que lleva a cabo la activación de dos tipos de proteína distintos: Janus kinasa (JAK), la cual compromete cuatro distintas tirosinas quinasas (JAK1, JAK2, JAK3 and TYK2), y los factores de transcripción STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6). La activación de la vía de señalización JAK-STAT pueden llevarla a cabo hormonas, factores de crecimiento y citocinas. La activación de los receptores de esta vía de señalización provoca la fosforilación de JAK que a su vez participa en la fosforilación de STAT, los cuales se traslocan al núcleo en forma de dímeros y actúan regulando la transcripción del ADN. En la regulación de esta vía de señalización intervienen diferentes mecanismos que controlan los estados de fosforilación de JAK y STAT y la actividad de SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling) (Nicolas et al., 2013)

En el SNC, JAK-STAT interviene en la regulación de multitud de procesos biológicos tanto en etapas del desarrollo como en el adulto, y en procesos inflamatorios y patologías neurodegenerativas. Como se ha mencionado brevemente en apartados anteriores, durante el desarrollo del SNC la vía JAK-STAT tiene una gran relevancia en la determinación neuronal o glial (Bonni et al., 1997; Taylor et al., 2007). En uno de los primeros estudios que demostraron la implicación de esta vía de señalización en la diferenciación glial en etapas del desarrollo, observaron como la activación de células precursoras en estadio de desarrollo por el factor de crecimiento CNTF conducía a la activación de JAK1, STAT1 y STAT3 provocando la diferenciación celular hacia el linaje astroglial (Bonni et al., 1997). Este mismo mecanismo ha sido descrito para otra serie de citocinas como LIF y IL-6 (Nakanishi et al., 2007). Otros estudios se han centrado en el papel de STAT3 sobre la diferenciación glial, en este sentido se ha observado como el bloqueo de STAT3 potencia la neurogénesis en estadios embrionarios mientras que se inhibe la astroglíogenesis (Cao et al., 2010).

2.1.8 Otros reguladores de la neurogénesis

Entre otros reguladores de la neurogénesis en la SVZ nos encontramos con las efrinas. Tanto las efrinas como sus receptores son proteínas de membrana, por lo tanto su interacción se lleva a cabo por contacto célula-célula. Las efrinas son proteínas que se expresan en la SVZ y juegan un papel importante en la regulación de la proliferación de las NSCs (Conover et al., 2000). Se ha observado como en animales *knockout* para el receptor de efrina EphA4 hay una reducción en la capacidad proliferativa de las NSCs. Sin embargo, animales *knockout* para EfrinaB3 muestran un incremento en la proliferación celular mediado por la proteína p53 (Theus et al., 2010). También se ha observado como la EfrinaB3 tiene un papel importante en patologías como la isquemia cerebral, incrementando la proliferación celular y potenciando la neurogénesis tras periodos isquémicos (Doepfner et al., 2011).

Otros reguladores de la neurogénesis son los neurotransmisores. Los neurotransmisores son pequeñas moléculas que intervienen en la comunicación celular y en la regulación de la neurogénesis. Por ejemplo, se ha observado como en patologías cerebrales asociadas a la producción de glutamato se incrementa la neurogénesis (Sharp et al., 2002). También se ha observado como las NSCs adultas tienen receptores para dopamina cuya activación puede alterar la proliferación de las NSCs (O'Keeffe et al., 2011). En situaciones de estrés celular se libera el neurotransmisor óxido nítrico, el cual puede ser producido por neuronas pero no por las propias NSCs y puede actuar como un regulador negativo de la proliferación celular en el adulto (Packer et al., 2003). Otro neurotransmisor que modula la neurogénesis es el ácido gamma-amino-butírico (GABA) que producido por neuroblastos controla la proliferación de las NSCs (Liu et al., 2005).

2.2 Mecanismos epigenéticos de regulación de la neurogénesis

La epigenética es el estudio de los cambios heredables en la función génica que se producen sin un cambio en la secuencia de bases del ADN. A continuación se explica brevemente los mecanismos epigenéticos generales que han sido implicados en la neurogénesis.

La estructura local de la cromatina puede influenciar la expresión de determinados genes y las modificaciones de la cromatina que se heredan. Estos cambios en la estructura de la cromatina pueden alterar el programa genético que ocurre en condiciones fisiológicas y por tanto jugar un papel importante en la regulación de las NSCs, tanto en su mantenimiento como en su diferenciación celular. Existen básicamente dos mecanismos que modifican los estados de la cromatina, por un lado, las modificaciones no covalentes debidas a la interacción proteína-proteína o proteína-ADN, y por otro lado, las modificaciones covalentes como la metilación, acetilación y modificaciones en los aminoácidos de las histonas. Por norma general, la acetilación de histonas se traduce en actividad transcripcional, mientras que la metilación de histonas se traduce en activación o represión transcripcional, en función de los residuos de cromatina modificados.

La **metilación del ADN** es uno de los principales mecanismos epigenéticos en vertebrados que se lleva a cabo por las enzimas DNAmetasas (Dnmts). A modo de ejemplo, se ha observado como Dnmt3 se expresa únicamente en los nichos neurogénicos y regula la metilación de regiones génicas relacionadas con la neurogénesis durante el desarrollo del SNC. Estudios en animales *knockout* para algunas de estas Dnmts muestran como la carencia de Dnmt3a en animales provoca la disminución de la neurogénesis, observándose un OB de menor tamaño (Wu et al., 2010a) y como la carencia de Dnmt1 es letal debido a las alteraciones durante el desarrollo del tubo neural (Li et al., 1992; Okano et al., 1999).

La metilación de ADN también es un proceso fundamental para el mantenimiento de identidades celulares, así pues, la regulación neurogénica-gliogénica durante el

Introducción

desarrollo embrionario y postnatal está mediado principalmente por este tipo de enzimas que metilan el ADN. Se ha observado como la metilación de distintos genes que regulan la diferenciación celular hacia alguno de sus linajes en concreto puede llevarse a cabo por la acción de factores de crecimiento o citocinas (Kohyama et al., 2008). Los promotores de los genes astrocitarios GFAP y S100 β responden principalmente a señales mediadas por los factores de transcripción STAT, por ello, durante el desarrollo embrionario se lleva a cabo la metilación de estos promotores favoreciendo la inhibición gliogénica (He et al., 2005). Por lo tanto, un cambio en la metilación del ADN de los genes específicamente de astrocitos, como el GFAP y S100 β , puede llevar a cabo la generación temprana de neuronas y de este modo determinar la diferenciación celular durante estadios embrionarios, postnatales y adultos.

La **desmetilación del ADN**, proceso inverso al anteriormente mencionado, también es un factor epigenético que regula la neurogénesis. A modo de ejemplo, Gadd45b promueve la desmetilación del ADN de los genes que codifican para BDNF y FGF-2, moléculas importantes para la regulación de la neurogénesis (Ma et al., 2009; Ma et al., 2010).

Otros mecanismos epigenéticos son las variaciones en la cromatina llevadas a cabo por la acetilación de histonas. Muchos residuos terminales de Lysina pueden ser **acetilados** por distintas enzimas acetiltransferasas (HATs), facilitando la accesibilidad al ADN y por lo tanto la transcripción, mientras que las **desacetilación** de histonas (HDACs) está involucrada en el silenciamiento génico. Se ha observado *in vitro* como el tratamiento con inhibidores de HDAC promueven el incremento de la producción neural y disminución de la diferenciación oligodendroglial (Siebzehnruhl et al., 2007), en este sentido, el valproato, fármaco para el tratamiento de la epilepsia, lleva a cabo la inhibición de HDATs teniendo como efecto la inducción de la diferenciación neural y la inhibición diferenciación glial (Hsieh et al., 2004; Yu et al., 2009). Mientras que el tratamiento con HDAC en ratones postnatales reduce drásticamente la neurogénesis de la SVZ (Foti et al., 2013). Por otro lado, la desacetilación de genes TLX promueve la proliferación de las NSCs (Sun et al., 2007).

2.3 El entorno y la neurogénesis

La neurogénesis es un proceso que está regulado de manera intrínseca en los nichos neurogénicos tal y como hemos expuesto hasta ahora. No obstante hay fenómenos extrínsecos, que llevan a cabo una regulación muy importante en la neurogénesis del individuo. En esta línea, mencionaremos como el aprendizaje, ejercicio físico, el estrés o la exposición a distintos estímulos puede generar beneficios o perjuicios en la neurogénesis fisiológica.

2.3.1 Olores

En mamíferos, la información que proporcionan los olores es transmitida hacia estructuras cerebrales en la corteza del OB. Estudios recientes demuestran como la exposición a distintos olores puede regular la neurogénesis del OB. En este sentido se ha observado como la exposición de olores en cortos periodos de tiempo no altera la supervivencia de las nuevas neuronas integradas en el OB, mientras que la exposición prolongada y pasiva de olores pueden enriquecer el entorno y potenciar la proliferación de la SVZ y la supervivencia de las nuevas células granulares en el OB (Mandairon et al., 2003, 2006; Sultan et al., 2010). Por otro lado, se ha determinado que la privación continua de olores reduce la supervivencia de las nuevas células integradas en el OB (Bovetti et al., 2009; Sultan et al., 2010).

2.3.2 Enriquecimiento ambiental

El enriquecimiento ambiental se basa en la estimulación física, cognitiva y sensorial (ver figura I14). El estrés físico o psicológico, la edad, la dieta o el ejercicio físico son parámetros ampliamente estudiados y relacionados con la neurogénesis endógena. En la actualidad, multitud de evidencias en animales y humanos demuestran como el enriquecimiento ambiental mejora la neurogénesis endógena en el adulto.

El incremento de la neurogénesis que se observa en ambientes enriquecidos, se relaciona con el incremento de moléculas como factores de crecimiento o factores tróficos que estimulan la neurogénesis endógena. En este sentido, se ha observado como con la edad se reducen los niveles de BDNF y VEGF (Duman et al., 2004), y que la

Introducción

reducción en los niveles de estas moléculas repercute negativamente en la neurogénesis y en las funciones de aprendizaje y memoria (Mattson et al., 2005). El estrés físico y psicológico también es un factor negativo para la neurogénesis, se ha observado como en situaciones de estrés se reduce número de nuevas neuronas incorporadas en el hipocampo (Duman et al., 2004). Por otro lado, se ha observado como ratones sometidos a ejercicio físico tienen incrementados los niveles de BDNF, de IGF-1 y de FGF-2 en el hipocampo, factores que mejoran la neurogénesis en el hipocampo de estos ratones (Gómez-Pinilla et al., 1997; Trejo et al., 2001). La dieta como factor ambiental también ha sido ampliamente estudiada en roedores, en esta línea, se ha observado como la restricción calórica incrementa los niveles de BDNF y la neurogénesis en el hipocampo de estos animales (Duan et al., 2003), y como la ingesta de determinadas sustancias como ácidos grasos omega-3, (Dyall et al., 2010), flavonoides (An et al., 2008) o arándanos (Casadesus et al., 2004) también favorece la neurogénesis en el hipocampo; mientras que otras sustancias como la cafeína (Wentz et al., 2009), etanol (He et al., 2005) o vitamina A (Bonnet et al., 2008) pueden desfavorecer la neurogénesis en el hipocampo. Por otro lado, se ha demostrado como el aislamiento social y la reducción de las horas de sueño repercuten negativamente en la neurogénesis (Meerlo et al., 2009).

También se han realizado estudios de enriquecimiento ambiental en enfermedades neurodegenerativas. En la enfermedad de Huntington el enriquecimiento ambiental incrementa los niveles de BDNF y DAPRPP-32 traducándose en un incremento en la neurogénesis (Hockly et al., 2002; Spires et al., 2004). En pacientes isquémicos, se ha observado como el enriquecimiento ambiental mejora la recuperación motora, disminuye el volumen de infarto, incrementa los niveles de BDNF e incrementa la proliferación celular en la SVZ (Dahlqvist et al., 2004; Gobbo et al., 2004; Komitova et al., 2005). En modelos animales de enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington la restricción calórica ejerce efectos neuroprotectores (Mattson et al., 2004, 2005).

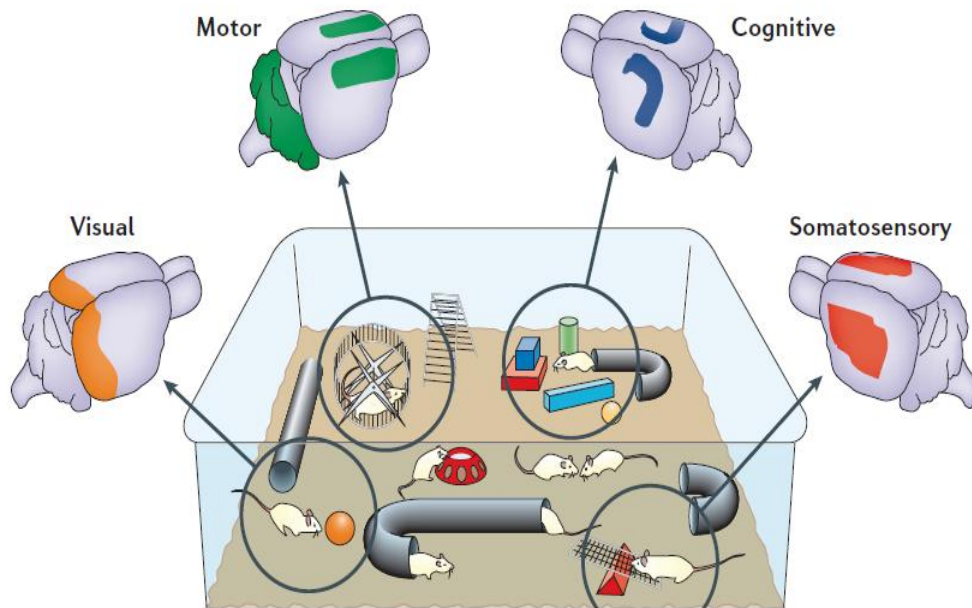


Figura I14. Esquema de modelos animales de enriquecimiento ambiental, somatosensorial, cognitivo, motor y visual. Nithianantharajah y Hannan, 2006.

3. INFLAMACIÓN, CITOCINAS Y LOS NICHOS NEUROGÉNICOS EN EL ADULTO

La actividad de las citocinas se descubrió en los años 60, cuando observaron que los sobrenadantes de cultivos de linfocitos tenían factores con actividades que podían regular la proliferación, diferenciación y maduración de distintos tipos celulares (Goldsby et al., 2000).

En condiciones fisiológicas, las citocinas ejercen un efecto importante en la regulación de procesos biológicos, actuando a bajas concentraciones y con un tiempo de vida media corto. El balance adecuado entre las diferentes citocinas es necesario para mantener un buen estado de salud en el organismo. Las citocinas pueden ejercer una acción sobre la propia célula que la ha producido o bien ejerciendo un efecto sobre otras células, es decir, presentan actividad autocrina y paracrina. Es importante mencionar que las citocinas pueden transportarse por vía sanguínea o linfática a otros tejidos y ejercer sus funciones en otros tejidos distintos a los que fueron sintetizadas. Otras características importantes de las citocinas son su pleiotropismo y redundancia. El pleiotropismo de las citocinas se da cuando una misma citocina ejerce distintas

Introducción

funciones celulares en función de la localización celular y tisular. La redundancia de las citocinas se da cuando distintas citocinas ejercen el mismo efecto. Por lo tanto, las funciones de las citocinas deben estar estrictamente reguladas.

Los receptores de las citocinas se caracterizan por tener una alta afinidad por sus ligandos y podemos encontrarlos en la superficie celular o bien como receptores solubles. En cualquier caso los receptores de las citocinas pueden estar expresados constitutivamente o bien ser inducidos por las propias citocinas. Existen distintos tipos de señalización celular de las citocinas como la vía de señalización JAK-STAT, como ya se mencionó en capítulos anteriores, la señalización por receptores con actividad tirosina quinasa o la señalización dependiente de proteína G.

La clasificación de las citocinas puede ser de tipo estructural o bien por las funciones que desempeñan. Desde el punto de vista estructural, las citocinas se han agrupado en familias atendiendo a su estructura tridimensional, de este modo, encontramos la familia de citocinas con una conformación de láminas- β , de α -hélice o una estructura compuesta por una composición α/β . Desde el punto de vista funcional pueden ser clasificadas atendiendo a distintos parámetros, como citocinas que actúan en la respuesta inmune innata o adaptativa, citocinas proinflamatorias o antiinflamatorias o citocinas implicadas en la proliferación y diferenciación celular. Las funciones de las citocinas son de gran variedad ya que intervienen en la respuesta del sistema inmunitario y en la respuesta inflamatoria. Recientemente se ha observado que las citocinas pueden regular en condiciones normales otros fenómenos biológicos, y entre ellos tener una implicación en la proliferación, diferenciación, migración o maduración de las NSCs (Monje et al., 2003; González-Pérez et al., 2012; presente tesis).

En cuanto a su participación en el sistema inmune y en la respuesta inflamatoria. Las citocinas que intervienen en el proceso inflamatorio, pueden diferenciarse en citocinas con una función proinflamatoria y aquellas con una actividad antiinflamatoria. En condiciones fisiológicas el balance es antiinflamatorio y las citocinas proinflamatorias se liberan al medio en fenómenos de daño tisular. Dentro del grupo de citocinas proinflamatorias encontramos aquellas que son liberadas ante una respuesta inmune o inflamatoria por monocitos y macrófagos, microglía y linfocitos Th1. Por otro lado, las citocinas antiinflamatorias actúan principalmente

Introducción

inhibiendo el efecto de las citocinas proinflamatorias y regulando el proceso inflamatorio.

La respuesta inflamatoria ante patógenos o lesiones, debe ser rápida y eficaz, pero por otra parte debe seguir un proceso altamente regulado generando primero una respuesta inmune innata, posteriormente una respuesta inmune adaptativa y por último una regulación del sistema inmune (Carpentier y Palmer, 2009). Todos los pasos requieren de una liberación de citocinas específicas que actúen ante el proceso inflamatorio (ver figura I15). Por lo tanto, requiere de un proceso de activación génica altamente regulado, ya que multitud de genes que codifican para moléculas mediadoras de la inflamación están constantemente reprimidos y requieren de un estímulo inflamatorio para llevar a cabo su síntesis.

En relación con la neurogénesis endógena, es importante recordar que en el nicho neurogénico se forma un microambiente en el que se originan comunicaciones celulares mediadas por las señales moleculares de las células que lo componen. En un episodio inflamatorio se desencadena la infiltración de macrófagos y linfocitos en el parénquima cerebral, estas células inflamatorias activan a los astrocitos y microglía residentes en el tejido pudiendo liberar multitud de factores proinflamatorios y antiinflamatorios, neurotransmisores o quimiocinas que pueden modular la neurogénesis endógena. Uno de los principales tipos celulares del SNC encargados en liberar citocinas al entorno es la microglía. La microglía, como principal efector del sistema inmune en el cerebro, se encuentra tanto en el parénquima cerebral como a lo largo de los ventrículos de la SVZ en contacto con las células B1, lo cual sugiere que las interacciones entre estas células puedan regular o alterar la neurogénesis (ver figura I16). La microglía en condiciones fisiológicas se encuentra en un estado denominado "resting", ejerciendo funciones de mantenimiento de la homeostasis tisular a través de su comunicación con astrocitos, neuronas y el resto de células de su entorno. En situaciones fisiológicas la microglía presenta un fenotipo ramificado que está asociado a la liberación de factores antiinflamatorios y factores neurotróficos (Streit et al., 2002). Sin embargo, en situaciones patológicas e inflamatorias la microglía adquiere una morfología de microglía activada, incrementa su cuerpo celular, reduce sus procesos y es capaz de mostrar una apariencia tipo macrófago en su estadio morfológico de mayor activación (Raivich et al. 1999). Este proceso de

activación también lleva a cabo la liberación de mediadores de la inflamación, como citocinas proinflamatorias, factores neurotróficos y el reclutamiento de macrófagos periféricos que migran al lugar de la lesión (Schwartz y Shechter 2010), con el fin de reparar la lesión generada y restablecer la homeostasis tisular.

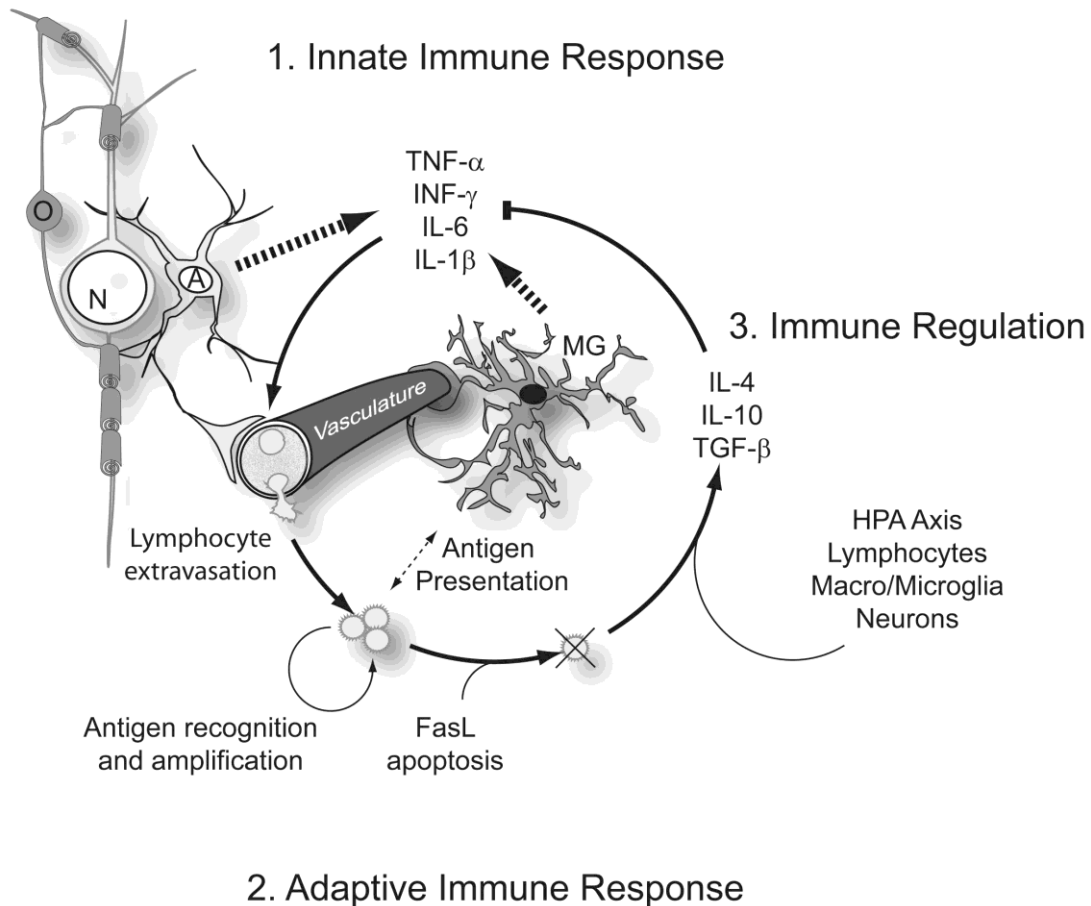


Figura I15. Esquema de los procesos que se llevan a cabo ante situaciones de neuroinflamación. En primer lugar se lleva a cabo una respuesta inmune innata en la que participan la microglía (MG) y los astrocitos (A) liberando citocinas proinflamatorias que afectan a la permeabilización vascular, permitiendo la extravasación de linfocitos en la zona afectada. En segundo lugar, se lleva a cabo una respuesta inmune adaptativa, donde los linfocitos extravasados median la eliminación de patógenos por el reconocimiento y presentación de antígenos. La respuesta inmune adaptativa finaliza con la regulación inmune, donde interviene FasL mediando los procesos apoptóticos de los linfocitos activados y por otro lado, la liberación de citocinas antiinflamatorias por parte de la microglía, astrocitos y neuronas. Carpentier y Palmer, 2009.

Multitud de modelos de neuroinflamación *in vitro* e *in vivo* emplean LPS (endotoxinas de la membrana externa de bacterias Gram negativas). La activación de la microglía por el LPS se ha visto que puede afectar negativamente a la producción de nuevas neuronas (Ekdahl et al., 2003; Monje et al., 2003). Estudios iniciales en este sentido demostraron como el proceso inflamatorio generado por la administración de LPS

Introducción

generaba una liberación de citocinas proinflamatorias como TNF α y IL-6 (Monje et al., 2003; Lindvall et al., 2005, 2006) que inhibía la neurogénesis (Ver figura I16). Se ha demostrado como la inhibición de la neurogénesis tras periodos inflamatorios se debe en parte a la activación de la microglía y la liberación de un gran número de citocinas y mediadores proinflamatorios como IFN γ , IL-1 β , TNF α , IL-6 o óxido nítrico, mientras que la microglía no activada no tiene efectos perjudiciales sobre la neurogénesis (Ben-Hur et al., 2003; Monje et al., 2003; Ekdahl et al., 2003; Torroglosa et al., 2007). Además, se ha observado como las neuronas generadas durante un periodo de inflamación tras el tratamiento con LPS, son morfológicamente normales pero su funcionalidad está alterada (Jakubs et al., 2008). También se ha observado como los animales transgénicos que sobreexpresan IL-6 producen una activación de la microglía similar a la producida por el LPS y estos animales tienen también reducida la producción de nuevas neuronas (Vallieres et al., 2002). Contrariamente, el tratamiento con antioxidantes, como el del ácido lipóico (Fike et al., 2007) o la administración de AINES (Antiinflamatorios no esteroideos) revierte la reducción en la tasa de neurogénesis generada por este estado inflamatorio (Monje et al., 2003).

La liberación al medio de mediadores proinflamatorios se ha observado en animales sometidos a irradiación cerebral. La inflamación generada por la irradiación del cerebro provoca la pérdida de neuronas en el hipocampo y los progenitores neurales que sobreviven a dicha irradiación tienen alterada la diferenciación neural (Monje et al., 2002; Mizumatsu et al., 2003; Monje y Palmer 2003; Rola et al., 2004). La reducción en la proliferación de los precursores neurales se observa incluso meses después de irradiar al cerebro, atribuyéndole efectos nocivos sobre las funciones básicas del hipocampo como la memoria o el aprendizaje.

La isquemia cerebral también induce un proceso inflamatorio, observándose un incremento de la microglía activada y un incremento de citocinas proinflamatorias, así como la infiltración de neutrófilos, macrófagos y otros mediadores celulares (Wang et al., 2007). Sin embargo, en modelos animales de isquemia cerebral se ha observado como se incrementa la neurogénesis tanto en la SVZ como en el GD del hipocampo, pudiéndose observar como los neuroblastos de la SVZ migran hacia la región isquémica, adquiriendo el fenotipo de las células dañadas (Zhang et al., 2001; Arvidsson et al., 2002). El incremento de la neurogénesis en modelos de isquemia

Introducción

cerebral posiblemente se debe al incremento de mitógenos en la región afectada, como por ejemplo glutamato, EPO, EGF y VEGF (Kernie y Parent 2010). Es importante mencionar que a pesar del incremento en la neurogénesis y migración de las nuevas neuronas hacia el lugar donde hay daño tisular, muy pocas neuronas se integrarán y adquirirán funcionalidad en el tejido, sugiriéndose que la reacción inflamatoria crónica desencadenada por el proceso isquémico contribuye a la muerte por apoptosis de los nuevos neuroblastos que migran al tejido dañado (Arvidsson et al., 2002; Kokaia et al., 2006).

Multitud de estudios con moléculas antiinflamatorias, como es el caso de los AINES, investigaron los efectos de éstos en procesos isquémicos y su relación con la neurogénesis. En esta línea, se ha observado como el tratamiento con indometacina, mejora la supervivencia celular tras episodios isquémicos (Hoehn et al., 2005b).

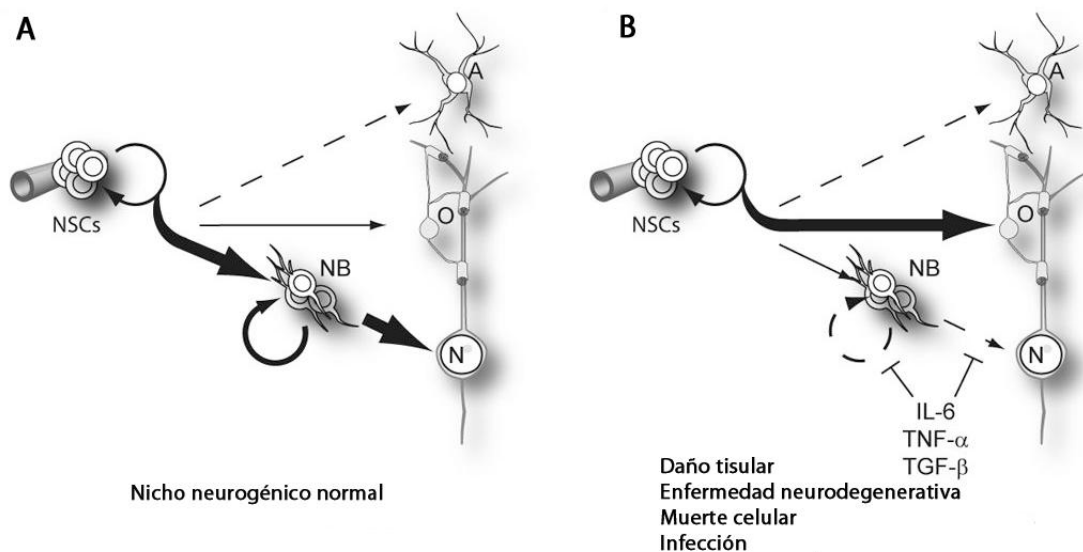


Figura 116. A. En condiciones fisiológicas las NSCs (NSCs) mayormente llevan a cabo una diferenciación neuronal, generando neuronas maduras (N) y en menor medida llevan a cabo una diferenciación glial, generando oligodendrocitos (O) y astrocitos (A). **B.** Sin embargo, en situaciones donde hay un daño tisular, muerte celular o patologías neurodegenerativas los mediadores proinflamatorios inhiben la neurogénesis y podrían incrementar la oligodendrogénesis. Modificado de Carpentier y Palmer, 2009.

4. PAPEL DE LAS CITOCINAS EN LA NEUROGÉNESIS

Interleucina 6 (IL-6)

La IL-6 clásicamente ha sido clasificada como citocina proinflamatoria debido a que su secreción es inducida por un gran número de estímulos proinflamatorios como el LPS o por la acción de otras citocinas proinflamatorias como el TNF α y la IL-1 β . Su producción está mediada principalmente por los monocitos-macrófagos activados, los linfocitos T y B activados y las células endoteliales. En el SNC se expresa principalmente por la microglía, los astrocitos y también en las NSCs (Vallieres et al., 2002; Klassen et al., 2003). Actúa como una potente citocina proinflamatoria pero también puede actuar suprimiendo la respuesta inmune al estimular la secreción de glucocorticoides o inhibiendo la síntesis de otras citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β o IFN γ (Xing et al., 1998). Se ha observado como la producción de IL-6, por la microglía activada, provoca la reducción de la proliferación, diferenciación y supervivencia neuronal en las NSCs del GD (Monje et al., 2003; Spooren et al., 2011). El rol anti-neurogénico de la IL-6 también ha sido demostrado *in vivo*, en ratones que sobreexpresan crónicamente esta citocina (Vallieres et al., 2002).

Interleucina 1 (IL-1)

La citocina proinflamatoria IL-1 es producida por numerosos tipos celulares como neutrófilos, macrófagos, linfocitos astrocitos, microglía y también por las propias NSCs (Klassen et al., 2003). La citocina IL-1 presenta dos isoformas, la IL-1 α y la IL-1 β , que son codificadas por distintos genes pero que actúan sobre los mismos receptores IL-1RI e IL-1RII (Sims et al., 1988), dichos receptores se expresan en el hipocampo pero no en las células progenitoras de la SVZ. En el cerebro, la expresión basal de IL-1 α es baja, regulándose positivamente en situaciones traumáticas o patologías asociadas a procesos inflamatorios (Mason et al., 2001; Kamm et al., 2006), por ejemplo, la IL-1, se encuentra sobreexpresada en enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer. En este sentido, en los animales deficientes para IL-1 α y IL-1 β se reduce la pérdida neuronal tras procesos isquémicos (Boutin et al., 2001); y se ha observado como la administración de IL-1 β reduce la proliferación y diferenciación de los

progenitores neurales (Wang et al., 2007; Koo y Duman, 2008), mientras que el bloqueo del receptor o el tratamiento con anticuerpos anti-IL-1 reduce la pérdida neuronal (Lu et al., 2005). Todo esto atribuye una función negativa de esta citocina en relación a la neurogénesis.

Tumor Necrosis Factor α (TNF α)

El TNF α es una citocina proinflamatoria producida por células del sistema inmunitario y por células del SNC como astrocitos, neuronas, microglía e incluso las NSCs (Klassen et al., 2003). En condiciones fisiológicas esta citocina se expresa en niveles muy bajos, pero incrementa sus niveles rápidamente ante un estímulo inflamatorio. El TNF α puede interactuar con dos receptores, TNFR1 o TNFR2, que están expresados tanto en neurona como en células gliales. Como norma general, esta citocina en elevadas concentraciones se ha determinado como neurotóxica (De Lella Ezcurra et al., 2010). En cuanto a su papel en la neurogénesis se ha observado como el TNF α afecta gravemente a la proliferación de las NSCs, reduce el número de nuevas neuronas e incrementa la población de astrocitos, debido a que dicha citocina favorece la expresión génica de Hes1, que actúa como represora neuronal (Iosif et al., 2006; Keohane et al., 2009; Whitney et al., 2009). El efecto negativo de esta citocina ha sido corroborado en otros estudios con ratones deficientes para el receptor TNFR1, observando en estos animales un incremento en la proliferación de las NSCs del hipocampo (Iosif et al., 2006).

Interleucina 15 (IL-15)

IL-15 es una citocina que tiene un papel muy importante durante el desarrollo y en la inmunidad del SN (Budagian et al., 2006). Se han detectado niveles de IL-15 en microglía, astrocitos, neuronas y en las NSCs de la SVZ y RMS (Gómez-Nicola et al., 2008a, b, 2011), sin embargo, el receptor de IL-15 se expresa en neuronas pero no en astrocitos, ni oligodendrocitos. Se ha observado que está involucrada en la diferenciación celular y en la auto-renovación de las NSCs, ya que animales *knockout* para la IL-15 muestran una reducción en la proliferación y diferenciación celular, mientras que la administración ICV de IL-15 potencia la proliferación y diferenciación neuronal (Gómez-Nicola et al., 2011).

LIF (Leukemia inhibitory factor)

LIF es una citocina conocida por dirigir la diferenciación celular de las NSCs de estadios embrionarios hacia el linaje celular adecuado (Williams et al., 1988). En el SN, la expresión endógena de LIF es muy baja pero en determinadas situaciones patológicas, como trauma o isquemia cerebral, se incrementa su síntesis y liberación (Bauer et al., 2003, 2006; Covey et al., 2007). En cuanto a su papel en la neurogénesis se ha observado como la exposición de LIF estimula la auto-renovación *in vivo* de las NSCs pero siempre y cuando sean estímulos agudos y no crónicos. Ya que se ha observado como la exposición crónica de LIF no promueve la neurogénesis adulta (Bauer et al., 2009).

Interleucina 18 (IL-18)

Esta citocina proinflamatoria actúa como cofactor de otra citocina, la IL-12, que a su vez estimula la liberación de la citocina IFN γ por los linfocitos Th1. Las fuentes principales de esta citocina son la microglía, los astrocitos y las células ependimales de la SVZ. Entre sus funciones se ha observado como la IL-18 provoca una inhibición de la diferenciación neural e induce la apoptosis de los progenitores neurales (Liu et al., 2005; Alboni et al., 2010).

Interleucina 4 (IL-4)

IL-4 es una citocina que se produce en linfocitos Th2, células B y microglía ante situaciones proinflamatorias. Funcionalmente se considera una citocina neuroprotectora ya que inhibe la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF α (Chao et al., 1993), potencia la supervivencia de las neuronas hipocampales *in vitro*, incrementa la proliferación de astrocitos y microglía (Araujo et al., 1993, 1995) y dirige la diferenciación de las NSCs hacia el linaje oligodendroglial (Butovsky et al., 2006, 2007).

Interferón gamma (IFN γ)

Se trata de una citocina proinflamatoria que generalmente se libera ante situaciones patológicas por parte de células del sistema inmune y células del SNC como astrocitos y microglía (Lees et al., 2005; Bogdan et al., 2006; Schmitz et al., 2008; Liesz et al.,

Introducción

2009; Li et al., 2010), pero también puede liberarse a niveles muy bajos en situaciones fisiológicas por parte de astrocitos y células endoteliales (Rady et al., 1995; De Simone et al., 1998; Wei et al., 2000). Actúa uniéndose a su receptor, IFN γ R, que está presente tanto en neuronas, astrocitos y progenitores neurales, por lo que es posible que el IFN γ ejerza un efecto directo sobre la población de precursores neurales y por lo tanto sobre la neurogénesis.

El IFN γ es uno de los objetivos de estudio de la presente tesis doctoral. En la fecha del inicio del presente trabajo apenas nada se conocía sobre sus acciones en la neurogénesis del cerebro adulto. En el transcurso del trabajo que aquí se muestra han surgido varios artículos en la bibliografía que la relacionan en diferentes aspectos de la biología de las NSCs y no todos ellos están en total consonancia; así como los resultados que se mostraran a continuación. Por esto, abordaremos todos estos aspectos de manera detallada en la discusión.

Interleucina-10 (IL-10)

La otra citocina que forma parte de la presente tesis doctoral es la IL-10. La IL-10 es un polipéptido no glucosilado, que se sintetiza por las células inmunológicas de tejidos neuroendocrinos y neurales. Actúa como un potente inhibidor de la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1, TNF α , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 (de Waal Malefyt et al., 1991, 1993; Fiorentino et al., 1991; Gruber et al., 1994) en situaciones normales y patológicas; y su presencia es esencial para mantener el equilibrio inmunológico del organismo (Kuhn et al., 1993).

Al iniciar el presente trabajo nada se conocía sobre el efecto directo de la IL-10 sobre los progenitores de la SVZ. Como hemos expuesto en el apartado anterior las novedades referentes a la acción de esta citocina en el contexto de la neurogénesis en el cerebro adulto serán expuestas en los siguientes apartados del presente trabajo.

OBJETIVOS

Objetivos

- a. Estudiar la acción de la citocina proinflamatoria IFN γ sobre la neurogénesis normal en el cerebro adulto mediante análisis de:**
 - a. La proliferación celular de la SVZ.
 - b. La población de neuroblastos presentes en la SVZ.
 - c. La diferenciación celular en la SVZ:
 - i. Diferenciación neuronal.
 - ii. Diferenciación oligodendroglial.
 - d. La integración final de las nuevas neuronas generadas en el área diana, el OB.

- b. Determinar la relevancia de la citocina antiinflamatoria IL-10 sobre la neurogénesis endógena en la SVZ mediante la evaluación de:**
 - a. La proliferación celular en la SVZ dorsal.
 - b. La diferenciación celular en la SVZ:
 - i. Diferenciación neuronal.
 - ii. Diferenciación oligodendroglial.
 - c. La integración final de las nuevas neuronas generadas en el OB.

MATERIAL

Y

MÉTODOS

1. ANIMALES

En la presente tesis doctoral se emplearon ratones machos C57BL/6J obtenidos de la casa comercial Charles River. Estos animales llegan a nuestro estabulario (Facultad de Medicina-Universidad de Barcelona) con 7 semanas de edad. Los animales se estabulan durante 1 semana y son utilizados para los experimentos a las 8 semanas. Por otro lado, hemos utilizado una colonia de animales de la cepa 129SV que estaba previamente estabilizada por nuestro grupo. También hemos empleado la colonia de animales deficientes para IL-10 que fueron originalmente obtenidos de Jackson Laboratory (Kuhn et al.,1993) y posteriormente estabilizada en el estabulario para su uso rutinario.

Todos los animales fueron estabulados con acceso a comida y bebida *ad libitum* en una habitación que se mantiene a temperatura constante (19-22°C), siguiendo un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas. Los tratamientos y procedimientos de manejo de animales han sido aprobados por el comité local (99/1) de la Universidad de Barcelona y la Generalitat de Catalunya (1094/99), de acuerdo con la Directiva de la Comunidad Europea (86/609/EU).

Todos los experimentos *in vivo* de esta tesis doctoral se realizaron sobre animales adultos machos de dos 8 semanas de edad.

1.1 Mantenimiento de colonias

1.1.1 Animales deficientes para IL-10

Son ratones de la cepa C57BL/10j que carecen de la IL-10. Los animales fueron obtenidos de Jackson Laboratory y para el mantenimiento de la colonia se realizaron cruces entre machos y hembras heterocigotos para IL-10. Los descendientes de dichos cruces se destetaron a las 3 semanas de edad y se genotiparon para su identificación. Del cruce se utilizaron los animales deficientes o *knockout* (KO), y los animales salvajes o *wild-type* (WT), mientras que los animales heterocigotos (Hz) se utilizaron para el mantenimiento de la colonia.

1.2 Genotipaje de animales producidos por el apareamiento entre parentales heterocigotos para la IL-10

Se obtuvieron muestras de cada animal empleando una pinza que se aplica sobre la oreja del ratón generando un orificio que sirve como marca identificadora y a la vez nos proporciona tejido suficiente para realizar el posterior genotipaje.

1.2.1 Extracción de ADN (REExtract-N-Amp Tissue PCR Kit; Sigma)

1.2.1.1 Material y reactivos

- REExtract-N-Amp Tissue PCR Kit:
 - Extraction Solution (Solución E)
 - Tissu Preparation (Solucion T)
 - Tissu Neutralization (Solucion N)

1.2.1.2 Procedimiento

- Añadir 100 µL de Extraction Solution y 25 µL de Tissue preparation por cada muestra.
- Dejar las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Poner las muestras durante 3 minutos a 98°C
- Añadir 100 µL de Neutralization Solution N

1.2.2 Amplificación por PCR

1.2.2.1 Material y reactivos

- Agua MiliQ estéril
- Primer KOIL10-WTR: 5'-GTGGGTGCAGTTATTGTCTCCGC-3'
- Primer KOIL10Fcom: 5'-GCCTTCAGTATAAAAGGGGGACC-3'
- Primer KOIL10MutR: 5'-CCTGCGTGCAATCCATCTTG-3'
- PCR Reaction MIX (Sigma)

1.2.2.2 Procedimiento

Para cada una de las muestras se añade un MIX de:

PCR Reaction Mix	10 μ L
Primer KOIL10-WTR	0,7 μ L (20 μ M)
IL-10 ComS PRIMER	1 μ L (20 μ M)
Primer KOIL10MutR	1,3 μ L (20 μ M)
H2O	3 μ L
V FINAL	16 μ L

Para cada muestra se añaden 16 μ L de MIX, mas 4 μ L de extracto de DNA, teniendo un volumen final de 20 μ L. Los 20 μ L de muestra se pondrán en el termociclador en las siguientes condiciones:

x35	Paso 1	94°C	5'
	Paso 2	94°C	30''
	Paso 3	65°C	2'
	Paso 4	72°C	30''
	Paso 5	72°C	30''
	Paso 6	15°C	END

1.2.3 Gel de agarosa

1.2.3.1 Materiales y reactivos

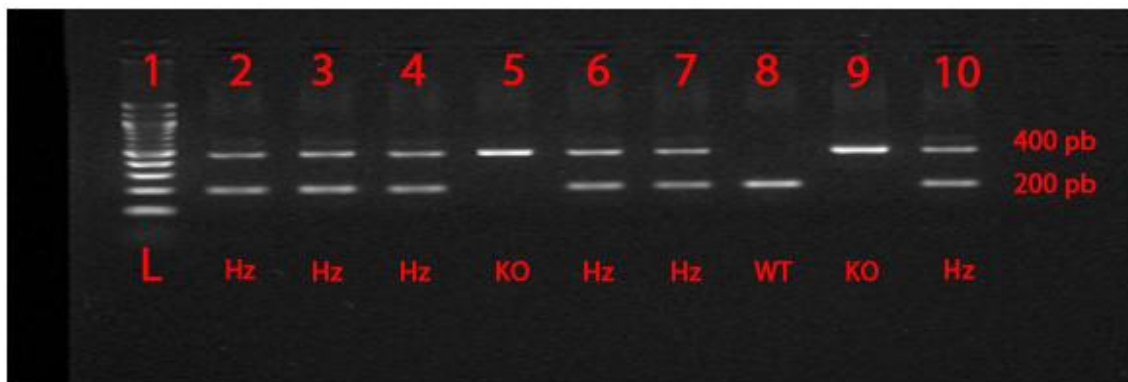
- Agarosa (Sigma A9539)
- TBE (Tampón Tris-Borato-EDTA)
- SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen S33102)
- Sistema de electroforesis horizontal
- Ladder de 100 bp (Invitrogen)
- Microondas
- Matraces aforados

1.2.3.2 Procedimiento

- Preparar una disolución de Agarosa en TBE 1X a una concentración de 1,5 gramos/100 ml.
- Calentar la disolución de Agarosa en el microondas hasta que hierva y sea totalmente transparente.
- Verter la disolución en un matraz aforado, añadir 7 µl de SYBR Safe y agitar.
- Verter la disolución suavemente sobre el sistema de electroforesis, evitando que se formen burbujas.
- Dejar que solidifique.
- Añadir TBE hasta que los pocillos estén sumergidos.
- Cargar el gel con una pipeta: siempre debe cargarse un marcador de pesos molecular, se cargará en el primer pocillo 10 µl de un marcador de peso molecular de 100 bp (Invitrogen) y después los 20 µl de cada muestra se cargarán en pocillos distintos.
- Poner la electroforesis a 100v y dejar que corra el gel aproximadamente 20 minutos.
- Observar en el transluminador y sacar una imagen de las bandas obtenidas.

1.2.4 Análisis de los resultados

Si el carril tiene una banda de 200 pb se trata de un animal WT y si tiene una banda de 400 pb se trata de un animal KO. Si presenta las dos bandas se trata de un animal heterocigoto (Hz). En la siguiente imagen se muestra un ejemplo representativo de muestras genómicas de la colonia de animales deficientes para IL-10 analizadas en un gel de agarosa.



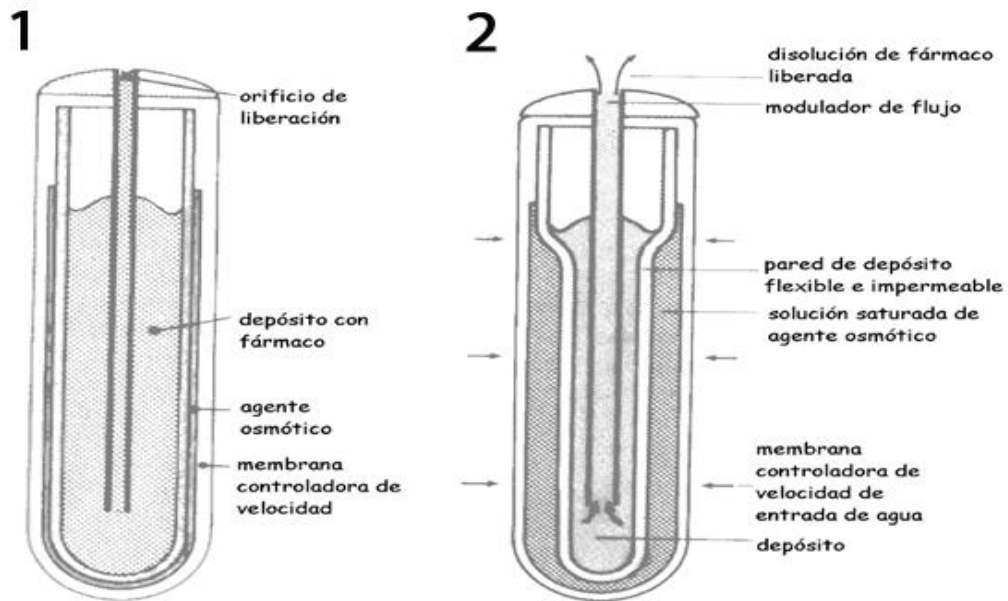
El primer carril de la imagen corresponde con el marcador de peso molecular (Ladder). El quinto y noveno carril corresponden con animales KO para la IL10 ya que únicamente se observa una banda a 400 pb (banda "KO") y el octavo carril corresponde con un animal salvaje ya que únicamente se observa una banda a 200 pb (banda "WT"). El segundo, tercer, cuarto, sexto, séptimo y decimo carril corresponde a animales Hz ya que observamos las dos bandas una a 200 pb y otra a 400 pb.

2. ADMINISTRACIÓN DE CITOCINAS *IN VIVO* MEDIANTE BOMBAS DE INFUSIÓN OSMÓTICAS (ALZET®)

2.1 Técnica de implantación de Bombas de Infusión Osmóticas Intracerebroventricular (ICV)

Las Bombas de infusión osmóticas utilizadas, son bombas ALZET compuestas por un reservorio (Model 1007D) y un Kit de Infusión (Brain Infusion KIT3). La bomba osmótica contiene un volumen de 90 μl ($\pm 10 \mu\text{l}$) y bombea la disolución a una velocidad de 0,5 $\mu\text{l/hr}$ ($\pm 0,1 \mu\text{l/hr}$) durante 7 días. Mencionar que comercialmente se ofrecen bombas osmóticas con distintos volúmenes y la utilización de una u otra se da en función del tiempo que se quiera infundir el fármaco.

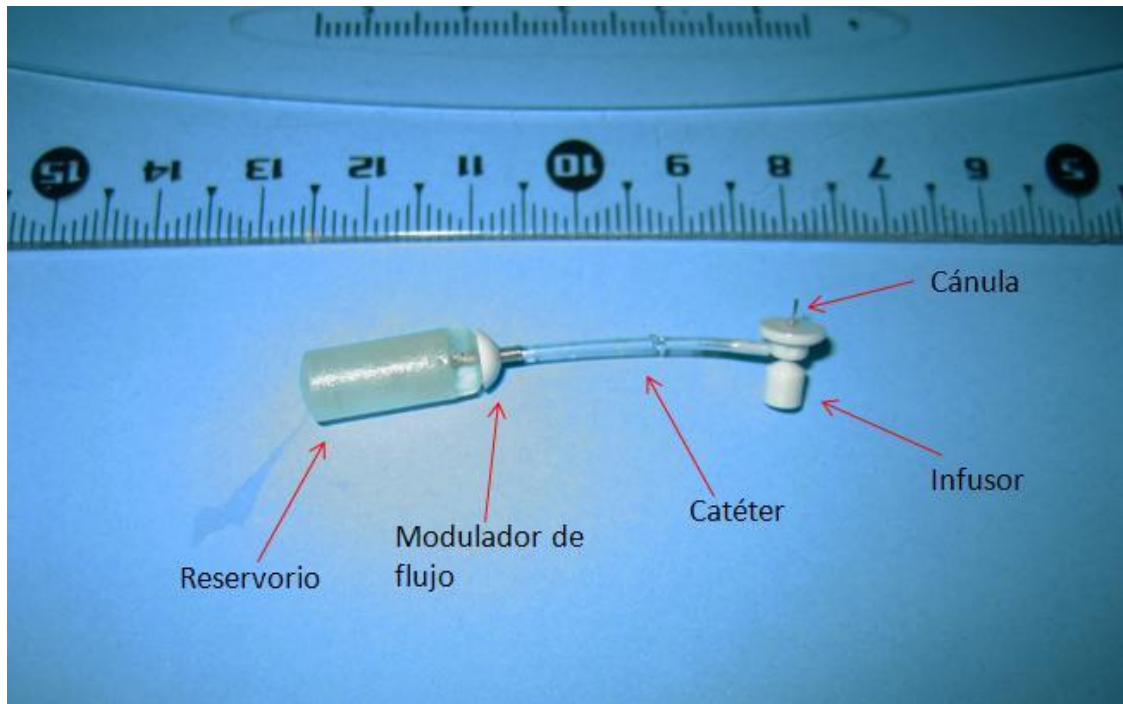
Las bombas de infusión se basan en sistemas con un núcleo osmótico central que contiene el factor, rodeado por una membrana semipermeable, con un orificio para la liberación del factor. El agente osmótico de la bomba de infusión absorbe agua del medio acuoso a una velocidad controlada por la membrana semipermeable. La presión que ejerce el agua absorbida comprime la pared flexible de reserva, provocando un flujo constante a través del orificio de liberación. El regulador de flujo minimiza las pérdidas por difusión y las burbujas de aire que podrían interrumpir el flujo. En la figura siguiente se presenta una bomba de infusión (1) que al absorber agua del entorno libera la disolución de fármaco que se cargó en el depósito anteriormente (2).



2.1.1 Partes de la Bomba de Infusión

- Reservorio: Lugar donde se añade el factor
- Modulador de flujo: Regula la liberación del factor a una velocidad constante.
- Catéter: Permite que el factor llegue al infusor
- Infusor: Soporte que contiene la cánula
- Cánula: Permite que el factor llegue al interior del cerebro
- Discos espaciadores: Permiten regular la profundidad de la cánula

La bomba de infusión, mediante un catéter, se conecta a un infusor que contiene una pequeña cánula que es la que se introducirá ICV en la SVZ (a modo de ejemplo ver figura siguiente). La cánula se introducirá mediante la ayuda de un equipo estereotáxico en las coordenadas determinadas precisas. El reservorio será implantado subcutáneamente en la espalda del animal, de aquí la necesidad de un catéter de cierta longitud (ver explicación posteriormente). Para nuestros experimentos hemos cargado las soluciones (salina, y con citocinas) en los reservorios de las bombas mediante una jeringuilla hipodérmica especial.



2.1.2 Preparación de las Bombas de infusión para su implantación

- Cortar el catéter con una longitud entre 1-2 cm.
- Conectar el infusor al catéter (fijándolo con una pequeña gota de “Loctite Superglu-3”).
- Colocar un disco espaciador en la base de la cánula y fijarlo con pequeñas gotas de pegamento que penetran por capilaridad.
- El modulador de flujo tiene un “capuchón” blanco, el cual se debe desplazar unos milímetros hacia abajo para poder conectarlo sobre el otro extremo de la cánula.
- Con una jeringuilla hipodérmica especial, rellenar por separado el reservorio de la bomba de Infusión y también el circuito Infusor-Catéter-Cánula. Por último, conectar ambas partes de la bomba de infusión osmótica.
- Observar que no hay burbujas en el interior del catéter y en caso de haberlas se desconecta el sistema y se vuelve a rellenar el circuito repitiendo el proceso.
- Hasta el momento de ser utilizada la bomba de infusión se mantiene en solución salina estéril.
- Preparar un segundo disco espaciador con una ranura que permitirá regular la profundidad de la cánula a las coordenadas que queremos.

2.1.3 Utilización de gases y anestesia

- Abrir la llave del protóxido a 1 bar de presión y la llave del oxígeno hasta 0,5 bares de presión.
- El agente anestésico utilizado es el isofluorano. Se debe comprobar que el dosificador de gases tiene isofluorano en la medida correcta y en caso de no ser así, rellenarlo con isofluorano. La medida correcta es observar como el nivel de isofluorano se encuentra entre el nivel superior e inferior del reservorio de anestesia.
- Del dosificador se abren tres ramas o tubos:
 - Uno de ellos va a la cámara de inducción.
 - Uno de ellos debemos conectarlo al estereotáxico.
 - El tercero sirve para conectarlo al estereotáxico y recoger el exceso de gases mediante una bomba de absorción.
- Para inducir la anestesia hay que cerrar la llave de tres pasos del resto de ramas y dejar abierta únicamente la que conecta con la caja de inducción. Posteriormente, se abre el dosificador al máximo y el animal se coloca dentro de la cámara de inducción hasta que se duerma. La carencia de reflejos corneales y podales asegura la correcta anestesia del animal.

2.1.4 Cirugía

2.1.4.1 Material necesario

- | | |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| ○ Tijeras grandes y pequeñas | ○ Cemento dental (Stoelting 51458) |
| ○ Pinzas grandes y pequeñas | ○ Lámpara |
| ○ Espátula | ○ Manta eléctrica |
| ○ Mosquito | ○ Betadine |
| ○ Bisturí | ○ Solución oftálmica |
| ○ Suturas 6.0 | ○ (SICCAFLUID 2.5mg, gel oftálmico) |
| ○ Taladro (broca pequeña de 8mm) | ○ Torundas |
| ○ Cauterizador | ○ Lupa binocular |
| ○ Solución Salina | |
| ○ Maquinilla eléctrica | |

2.1.4.2 Procedimiento

- Encender la lámpara para tener visibilidad; encender la manta eléctrica, cuyo detector está en contacto con el animal en todo momento para mantener la temperatura corporal y poder monitorizarla.
- Anestesiarse el animal en la cámara de inducción.
- Rasurar la zona quirúrgica haciendo uso de una maquinilla eléctrica y posteriormente limpiar la zona quirúrgica con solución salina.
- Inmovilizar el animal en la plataforma del estereotáxico. Para ello se fija el animal por los incisivos y se introduce una varilla lateral por cada oído. Por último, comprobar que el cráneo del ratón está totalmente sujeto, sin ningún tipo de movilidad y que la superficie del cráneo está totalmente paralela a la plataforma del estereotáxico.
- Dirigir la anestesia al sistema estereotáxico, para ello debe cerrarse el tubo que va a la cámara de inducción y abrir el tubo que conecta con el estereotáxico. En este momento también se conecta la bomba de absorción que recoge el excedente de gases.
- Colocar pomada oftálmica en los ojos del animal (SICCAFLUID 2,5 mg, gel oftálmico) para prevenir que se seque la mucosa óptica del animal durante el proceso quirúrgico.
- Realizar una incisión longitudinal en la piel del cráneo del ratón con el bisturí y separar la piel para exponer el cráneo. Limpiar la zona quirúrgica con una torunda y rascar suavemente la superficie craneal con una espátula pequeña con el fin de dejar la superficie lo más lisa posible.
- Se debe generar una cavidad en la espalda del animal donde implantar el reservorio de la bomba de infusión, para ello se introducen unas tijeras pequeñas al final de la incisión craneal anteriormente hecha, cerca de la zona cervical, y abriendo y cerrando las tijeras en el interior se separa la piel del músculo, generando un espacio o cavidad donde posteriormente se implantará la bomba de infusión.
- Localizar Bregma. Con la ayuda de una lupa binocular se localiza bregma visualmente, posteriormente, se coloca un rotulador fino en el brazo mecánico del estereotáxico y mirando por la lupa se marca Bregma con un punto. A partir

Material y Métodos

de este punto, se mueve el brazo del estereotáxico en las coordenadas precisas donde se implantará la cánula y se marca el punto de interés con el rotulador. Para nuestros experimentos las coordenadas son: -0,1 anterior, +0,6 lateral (escala nonius), 1,7 mm de profundidad. Con estas coordenadas conseguimos que la infusión se localice en el LV adyacente a la SVZ que es nuestra zona de interés.

- Taladrar en la zona de interés, intentando que el orificio se ajuste lo máximo al punto marcado y sea lo más fino posible. Nos ayudaremos de una lupa binocular para observar y trabajar con precisión.
- Acoplar la bomba de infusión, preparada y conservada en solución salina, en el brazo mecánico del estereotáxico. Posteriormente, introducimos el reservorio de la bomba de infusión en la cavidad generada en la espalda del animal y con ayuda de la lupa binocular introducimos la cánula en el orificio generado en el cráneo. Una vez introducida la cánula se deja un par de minutos en el interior y transcurrido este tiempo se introduce el segundo disco espaciador que nos permite dejar la cánula a la profundidad deseada (1,7 mm).
- Usar una gota de pegamento para fijar el segundo disco espaciador a la bomba de infusión y a su vez a la superficie del cráneo.
- Separar la bomba de infusión de su anclaje en el estereotáxico con ayuda de un cauterizador.
- Suturar el animal con suturas de seda 6.0 y sellar la zona quirúrgica con cemento dental.
- Añadir Betadine a la sutura con una torunda y retirar el animal de la anestesia.

A modo ilustrativo, el resultado final puede observarse en la siguiente imagen.



2.2 Seguimiento del animal

Una vez implantadas las bombas de infusión se realiza un seguimiento diario de los animales. Se observa si el animal presenta algún síntoma de dolor, de mal estar e inmovilidad, en cuyo caso se procedería a sacrificar el animal. También se presta atención a las suturas realizadas, la posición de la bomba de infusión y cualquier tipo de observación que pueda darnos indicios de que la bomba de infusión no está ejerciendo su cometido, en cuyo caso también se procedería a sacrificar el animal.

2.3 Soluciones administradas en bombas de infusión ICV

2.3.1 Vehículo

Suero salino estéril y frío. Los animales administrados con vehículo los llamaremos controles.

2.3.2 IFN γ

Recombinant Murine IFN γ (Peprotech; Ref.: 210-10) se resuspende en agua estéril a concentración stock de 50 ng/ml, se alícuota y se guarda a -80 °C. La bomba se rellenará con una dilución 1:1000 del stock en suero salino estéril, siendo la concentración final a infundir de 50 pg/ml.

2.3.1 IL-10

Recombinant Murine IL-10 (Peprotech; Ref.: 315-05) se resuspende en agua estéril a concentración stock de 50 ng/ml, se alícuota y se guarda a -80 °C. La bomba se rellenará con una dilución 1:1000 del stock en suero salino estéril, siendo la concentración final a infundir de 50 pg/ml.

2.4 Administración intraperitoneal (I.P.) de BrdU a los animales

2.4.1 BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine)

Es un nucleósido sintético, análogo de la timidina, que puede ser reconocido por anticuerpos específicos. El BrdU se incorpora en la nueva síntesis de ADN de las células replicantes (durante la fase S del ciclo celular).

Se ha utilizado BrdU en polvo (BrdU; Sigma B5002-5G), del cual se prepara una disolución para inyectar a una concentración de 10 mg/ml en suero salino estéril, que se alícuota y conserva a -20 °C hasta el momento de su uso.

La administración de BrdU siempre se realiza i.p, a una dosis de 50 mg/kg/día. En función de los grupos experimentales de animales se administra BrdU durante un número variable de días.

2.4.2 Grupos experimentales de animales para el marcaje de células nuevas con BrdU

2.4.2.1 Animales administrados ICV con IFN γ durante 7 días (ganancia de IFN γ a 7d)

Se administró una dosis diaria de BrdU i.p durante 7 días consecutivos y en el séptimo día los animales se sacrificaron para la obtención de muestras.

En este grupo de animales se realizaron los estudios histológicos para determinar la evolución de la SVZ durante los 7 días que las bombas de infusión están administrando los factores. Básicamente determinaremos el proceso general de las células en proliferación (células BrdU+) y el número de tipos neurales (células DCX+, Olig2+).

2.4.2.2 Animales administrados 4 días con IFN γ para describir procesos de diferenciación (ganancia de IFN γ a 4d)

En este grupo experimental se inyecta una única dosis de BrdU previa a la administración ICV de los fármacos, de este modo se marcan las células que están proliferando en la SVZ antes del tratamiento. Las bombas de infusión se implantan durante 4 días con el objetivo de determinar fenómenos de diferenciación ya que 4 días es el tiempo óptimo para estos estudios (Doetsch et al., 1999). Al final del experimento los animales se sacrifican y se determina el fenotipo en el que se han convertido las células BrdU marcadas al principio del experimento. Realizaremos inmunofluorescencias para marcar la población BrdU que exprese conjuntamente DCX u Olig2.

2.4.2.3 Para describir la integración de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio (OB)

Dentro de este grupo encontramos dos subgrupos:

- 1) Grupo experimental de los animales WT y KO para IL-10. A los animales para el estudio se administra durante 2 días una dosis diaria de BrdU i.p y se deja un tiempo de espera de 30 días. Al final del experimento los animales se sacrifican para los análisis histológicos tanto de la SVZ como del OB.

- 2) Grupo experimental de los animales administrados ICV con citocinas. A estos animales se les administra los 2 primeros días a la implantación de la bomba una dosis diaria de BrdU i.p.; y se dejan en espera 17 días. Al final de este término los animales son perfundidos para los análisis histológicos tanto de la SVZ como del OB. El hecho de que en estos animales el tiempo de espera antes de la perfusión sea menor, es debido a previas observaciones donde se percibió que la implantación de las bombas de infusión en los ratones podrían generar una lesión en la zona suturada al cabo de unas semanas y quisimos evitar esto, entro otros motivos porque podría afectar al resultado de nuestros estudios

3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA HISTOLOGÍA. PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES

3.1 Muestras para análisis histológico

Para la obtención de muestras para análisis histológicos se fijó el tejido con PFA 4% disuelto en tampón fosfato 0,1M pH7,4 mediante perfusión transcardiaca con la finalidad de conservar las propiedades morfológicas del tejido.

3.1.1 Perfusión transcardiaca

3.1.1.1 Material

- PFA 4% frio y preparado el día anterior
- Suero salino frio
- Pinzas grandes y pinzas pequeñas
- Tijeras grandes y tijeras pequeñas
- Tubos Falcon de 15 ml
- 2 Jeringuillas de plástico de 20 ml
- Cánula

3.1.1.2 Procedimiento

- Anestesiar el animal en una cámara de inducción con isofluorano.
- Inmovilizar el animal sobre una superficie plana
- Abrir la cavidad torácica con unas tijeras.
- Canular el ventrículo izquierdo hasta el punto donde nace la aorta.
- Cortar la aurícula derecha con unas pinzas pequeñas.
- Conectar una jeringa de 20 ml cargada con NaCl 0,9% a la cánula y perfundir manualmente a una velocidad constante y suave.
- Repetir el paso anterior con una jeringa cargada de PFA 4%.
- Extracción del cerebro y conservación del cerebro en un tubo debidamente rotulado con PFA 4% durante 24 horas.

3.1.2.2 Postfijación

Una vez obtenida la muestra por perfusión transcárdica el cerebro debe quedar sumergido durante al menos 24h a 4°C en PFA 4%. Pasado este tiempo el cerebro se sumerge en PBS y se almacena a 4°C hasta su uso.

3.2 Obtención de cortes con criostato

3.2.1 Procedimiento y crioconservación

Los criostatos son dispositivos que permiten realizar cortes de un tejido de un grosor determinado a bajas temperaturas. Las muestras que van a ser procesadas en un criostato se deben crioproteger, ya que van a ser congeladas para su procesamiento. Para crioproteger el tejido se empleó una solución crioprotectora de PBS-Sacarosa 30%. Como mínimo el cerebro permanecerá 48 horas en la solución crioprotectora antes de ser cortado. Inicialmente se observa como dada la alta densidad de la solución el cerebro queda flotando en la solución crioprotectora, y con el transcurso del tiempo el tejido va embebiéndose y hundiéndose en dicha solución, indicando que el tejido está listo para ser procesado.

3.2.1.1 Procedimiento

- Separar el OB del resto del cerebro.
- Para realizar criosecciones coronales de cerebro, se pondrá una base de Tissue Freezin Medium (Jung; Leica Microsystem) en un recipiente con nieve carbónica sobre el que se fija verticalmente el cerebro y se deja congelar. Este paso puede durar 10-15 minutos y es muy importante que el cerebro esté bien congelado para su posterior procesamiento.
- Para realizar secciones del OB, éste debe embeberse con Tissue Freezin Medium en un molde para facilitar su manipulación y orientación en el criostato. Del mismo modo que con el cerebro, deberemos esperar entre 10-15 minutos para que el tejido esté completamente congelado y listo para ser procesado en el criostato.
- Establecer las condiciones que se emplearan para realizar criosecciones
 - Temperatura del criostato: -22 - -28°C
 - Grosor de la sección: 18 µm
- Modo de obtención de criosecciones:

Para nuestros estudios se realizaron cortes consecutivos de 8 portaobjetos/serie, donde se incluyeron 15-18 criosecciones por cada portaobjetos, tanto para cortes de SVZ como para cortes de OB. Se realizaron dos series de 8 portas por cada animal. De este modo los portaobjetos de cada serie tendrán una muestra representativa y homogénea de cada animal.

3.2.2 Preparación de portaobjetos gelatinados

Los portaobjetos gelatinizados incrementan la adhesión del tejido y permiten realizar correctamente experimentos de inmunohistoquímica, por ello es necesario gelatinizar los portaobjetos para procesar las muestras.

3.2.2.1 Material

- Solución de gelatina:
- 500 mL de agua destilada
- 2,6 g de GELATIN (G2500 Sigma)
- 0,15 g de Sulfato de cromo y potasio, $\text{CrK}(\text{SO}_4) \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Fisher)

3.2.2.2 Procedimiento

- Mezclar en un vaso de precipitados 500 ml de agua destilada con 2,6 gramos de gelatina.
- Calentar suavemente la disolución con agitación constante a velocidad moderada evitando que se formen burbujas.
- Agregar el sulfato de cromo y potasio a la disolución de gelatina.
- Al disolverse la sal retirar del agitador y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Filtrar la disolución final usando embudo y papel filtro.
- Una vez esté la disolución filtrada y fría, se puede usar para gelatinizar los portas.

Se sumergen los portaobjetos en la solución gelatina durante 45 segundos y se retiran con mucho cuidado evitando que queden las burbujas sobre la superficie del portaobjetos. Por último, se dejan secar a temperatura ambiente durante 24 horas y se conservan a 4°C grados hasta su uso.

4. TÉCNICAS DE INMUNOFLOURESCENCIA

4.1 Inmunofluorescencia en secciones histológicas y en células

La característica especial de esta técnica es que el anticuerpo primario que reconoce el antígeno de interés será reconocido por un anticuerpo secundario que esta conjugado a un fluorocromo. El fluorocromo se excita con una longitud de onda determinada en los microscopios de fluorescencia convencionales y/o confocales y emitirá fluorescencia a distintas longitudes de onda que podremos recoger. En la siguiente tabla se detalla la longitud de onda de absorción y emisión de distintos anticuerpos secundarios Alexa y el color de emisión de cada uno de ellos.

Material y Métodos

	Absorción Máxima (nm)	Emisión Máxima (nm)	Color de Emisión
Alexa Fluor® 350	346	442	Blue
Alexa Fluor® 405	401	421	Blue
Alexa Fluor® 430	433	541	Green/Yellow
Alexa Fluor® 488	496	519	Green
Alexa Fluor® 532	532	553	Yellow
Alexa Fluor® 546	556	573	Orange
Alexa Fluor® 555	555	565	Orange
Alexa Fluor® 568	578	603	Orange/Red
Alexa Fluor® 594	590	617	Red
Alexa Fluor® 610	612	628	Red
Alexa Fluor® 633	632	647	Far Red
Alexa Fluor® 635	633	647	Far Red
Alexa Fluor® 647	650	665	Near-IR***
Alexa Fluor® 660	663	690	Near-IR***
Alexa Fluor® 680	679	702	Near-IR***

4.1.1 Inmunofluorescencia en secciones histológicas

4.1.1.1 Material

- PBS pH 7,4
- PBS pH 7,4 + 0,2% Tritón
- Suero
- Anticuerpos primarios y secundarios
- Marcador de núcleos TO-PRO3 (Molecular probes; Ref.:T3605)
- Medio de montaje Prolong (Molecular Probes; Ref.: P36934)
- Cubreobjetos

4.1.1.2 Inmunofluorescencia en secciones histológicas

- En primer lugar los portaobjetos seleccionados se sacan del congelador y se dejan secar durante 60 minutos.
- Una vez secos, los portaobjetos se depositan en jarras o cubetas para inmunohistoquímica con PBS pH 7,4 durante 60 minutos, para hidratar el tejido.
- Si se va a detectar BrdU debe realizarse un pretratamiento, sino pasaríamos al punto siguiente. El pretratamiento consiste en incubar las muestras con HCl 2M durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se realizan 6 lavados de 10 minutos con PBS, para eliminar y neutralizar el HCl.
- Permeabilizar las células, para ello se realizan 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tritón 0,2 %.
- Bloquear las uniones inespecíficas de la muestra. Para ello se realiza una solución que consiste en una disolución de suero al 10 % en PBS-Tritón 0,2 %, y se incuban las muestras durante 1 hora en dicha solución. El suero utilizado debe ser de la misma especie que en la que fue generado el anticuerpo secundario.
- Posteriormente se incuba el anticuerpo primario a la dilución conveniente overnight a 4°C.
- Lavar las muestras, realizando 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tritón 0,2 %.
- Añadir el anticuerpo secundario correspondiente: Alexa 488; Alexa 546 (1:1000; Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Realizar 3 lavados de 10 minutos con PBS.

- Añadir un marcador de núcleos (TO-PRO3) durante 30 minutos a una dilución 1:1000 en PBS.
- Montar las muestras con cubreobjetos y medio de montaje ProLong (Invitrogen) y almacenar a 4°C hasta su uso.

4.1.2 Protocolo inmunofluorescencia sobre cultivos en monocapa

En primer lugar para la realización de inmunofluorescencias sobre cultivos en monocapa, deben fijarse las células. A continuación se detalla el protocolo de fijación de células seguido de la inmunofluorescencia en los cultivos en monocapa.

4.1.2.1 Materiales

- PBS pH 7,4
- Paraformaldehido (PFA) 4%.
- Thimerosal (1:1000 en PBS)
- PBS pH 7,4 -Tritón 0,1%
- Suero
- Anticuerpos primarios y secundarios
- Marcador de núcleos Hoechst-33258 (Sigma)

4.1.2.2 Procedimiento

- Previamente a la fijación de las células se añadirá BrdU 4 horas antes de fijar la placa, a una concentración final en el pocillo de 10µM.
- Aspirar con mucho cuidado el medio de cultivo para evitar desprender o lesionar las células.
- Fijación: Añadir PFA al 4% fresco de manera que cubra el pocillo y dejarlo incubando 10 minutos a RT.
- Hacer 3 lavados de 10 minutos de PBS.
- Añadir Thimerosal para conservar la placa a 4°C hasta realizar la inmunofluorescencia.
- Hacer tres lavados de 10 minutos de PBS.

Material y Métodos

- Para la detección del BrdU, debe hacerse un pretratamiento con HCL 2M durante 15 minutos y posteriormente realizar 3 lavados de 10 minutos con PBS, sino se va a realizar la inmunodetección de BrdU se pasa al punto siguiente.
- Permeabilizar las células con PBS-Tritón 0,1% durante 15 minutos.
- Preparar la solución de bloqueo con PBS-Tritón 0,1% y suero a una concentración del 1%. Siempre eligiendo un suero de la especie en la que esté hecho el anticuerpo secundario que se vaya a usar para evitar las uniones inespecíficas.
- Añadir la solución de bloqueo y dejar incubando 20 minutos.
- Añadir los anticuerpos primarios en PBS-Tritón 0,1% a la concentración correspondiente e incubarlos overnight a 4°C.
- Hacer 3 lavados de 10 minutos de PBS.
- Añadir el anticuerpo secundario correspondiente: Alexa 488; Alexa 546 (1:1000; Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Hacer 3 lavados de 10 minutos de PBS.
- Añadir el marcador de núcleos Hoechst-33258 durante 15 minutos.
- Hacer 3 lavados de 10 minutos de PBS.
- Añadir PBS-Thimerosal y conservar a 4°C hasta el análisis de la inmunofluorescencia.

4.2 Anticuerpos empleados

A continuación se detalla una tabla con los anticuerpos primarios empleados y las concentraciones a las que fueron empleadas. También se detalla una tabla para los anticuerpos secundarios empleados.

Anticuerpos primarios	Dilución empleada	Casa comercial	Referencia
BrdU	1:400	Abcam	Ab6326
DCX	1:500	Cell Signaling	4604
Olig2	1:500	Millipore	AB9610
NeuN	1:500	Millipore	MAB377
Nestina	1:200	BD Pharmingen	556309
PCNA	1:500	Calbiochem	NA03
Ki67	1:500	Millipore	AB9260
GFAP	1:1000	DakoCytomatio	Z 0334
NG2	1:200	Millipore	A5320
β III-Tubulina	1:2000	Promega	G7121

Anticuerpos secundarios	Dilución empleada	Casa comercial	Referencia
Alexa 488 donkey antiRabbit	1:1000	Invitrogen	A21206
Alexa 546 donkey antiRabbit	1:1000	Invitrogen	A10040
Alexa 488 donkey antiMouse	1:1000	Invitrogen	A21202
Alexa 546 donkey antiMouse	1:1000	Invitrogen	A10036
Alexa 488 donkey antiRat	1:1000	Invitrogen	A21208
Alexa 488 donkey antiGoat	1:1000	Invitrogen	A11055

5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS POR MICROSCOPIA

5.1 Análisis por microscopía confocal

Todos los análisis histológicos sobre la SVZ de los animales se procesaron por microscopía confocal (Leica modelo TCS SPE). Para cada muestra se obtuvieron imágenes de toda la SVZ (ventral y dorsal) de tres cortes histológicos consecutivos, comprendidos entre bregma 0,02 mm y bregma 0,38 mm. Antes de iniciar la captación de imágenes, por un lado, se establecieron las mejores condiciones de luz, offset y porcentaje del laser de excitación, que se mantuvieron en cada uno de los experimentos, y por otro lado, se calculó el grosor de cada uno de los cortes analizados (volumen Z) para obtener imágenes del mismo campo cada 2 μm de profundidad y de este modo obtener un escaneado de toda la SVZ.

Por norma general, para obtener las imágenes que después se emplearon para realizar cuantificaciones se utilizó un objetivo de 40x aumentos, para poder visualizar con mayor precisión la estructura celular y las posibles colocalizaciones. En ocasiones se tomaron imágenes con objetivo de 20x aumentos o de 10x aumentos para obtener una imagen general del tejido.

Tras la obtención de las imágenes, se llevó a cabo la cuantificación del número de células positivas en la SVZ para cada uno de los anticuerpos empleados. Para realizar el conteo celular se empleó el mismo programa informático del sistema de microscopía confocal, programa LAS-AF-Lite. Por último, todos los datos obtenidos se trasladaron a una hoja Excel sobre la que se trabajó posteriormente la estadística.

5.2 Análisis del OB por microscopía invertida de fluorescencia

Para el análisis de las inmunofluorescencias del OB, las muestras se analizaron con un microscopio invertido de fluorescencia (Leica modelo DMI 4000B). Se realizaron fotos a 20x aumentos de todo el OB de tres cortes histológicos consecutivos comprendidos entre bregma de 4,28mm y 3,92mm.

Los contajes celulares realizados sobre estas imágenes se realizaron empleando el programa informático Image J, donde se cuantifica cada una de las células positivas para cada uno de los marcadores utilizados. Por último, todos los datos obtenidos se trasladaron a una hoja Excel sobre la que se trabajó posteriormente la estadística.

5.3 Análisis de las inmunofluorescencias de cultivos celulares por microscopía invertida de fluorescencia

Las inmunofluorescencias de los cultivos celulares se analizaron por microscopía invertida de fluorescencia (Leica modelo DMI 4000B). Para ello se realizaron aleatoriamente 9 fotos, a 200x aumentos, de cada uno de los pocillos y siempre se analizaron tres pocillos de cada una de las condiciones por cada experimento. Por último, se llevo a cabo la cuantificación celular de los marcadores utilizados usando el programa informático Image J y todos los datos obtenidos se trasladaron a una hoja Excel sobre la que se trabajó posteriormente la estadística.

6. ESTADÍSTICA

6.1 Estadística de los valores obtenidos de las inmunofluorescencias sobre tejido adulto

Tras el análisis de histológico de cada uno de los marcadores de la SVZ y el OB, se realizó la media aritmética de las cuantificaciones de los tres cortes consecutivos analizados para cada animal, siendo éste el valor final de cada animal. Posteriormente se agruparon los datos en grupos experimentales control/tratamiento y se realizó la media aritmética y el error estándar de la media (S.E.M.) de cada uno de los grupos experimentales. Por último, se compararon ambos grupos con la prueba T de Student, obteniendo el valor de significancia P.

6.2 Estadística de los valores obtenidos sobre las inmunofluorescencias en cultivos disociados primarios de la SVZ

De cada una de las fotos obtenidas se cuantificó el número total de células positivas para los distintos marcadores. Posteriormente los resultados se expresaron en porcentaje respecto al número total de células (Hoechst+). Por último, se realizó la media y el error estándar de la media (S.E.M.) de los tres pocillos para cada condición, siendo este valor el resultado experimental final. Siempre se realizaron al menos tres experimentos distintos, para cada uno de los marcadores cuantificados, en los cuales se calculó la media y el S.E.M. y su significancia se analizó mediante la prueba T de Student.

RESULTADOS

RESULTADOS SECCIÓN I:

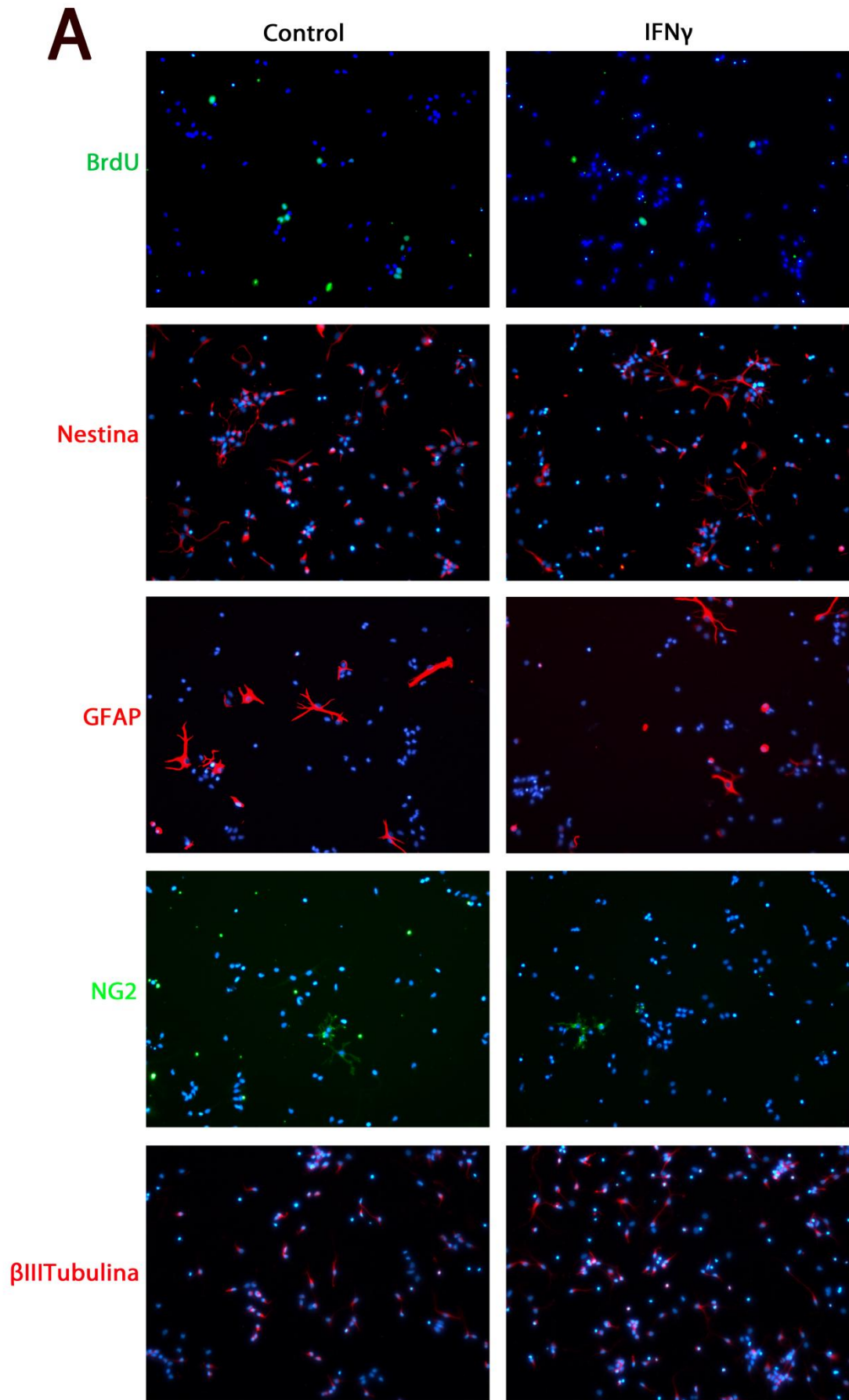
Efectos del IFN γ sobre la neurogénesis normal en el cerebro adulto.

1. Validación *in vitro* de los lotes de IFN γ para ser empleados *in vivo*

El efecto que ejerce el IFN γ *in vitro* en cultivos primarios disociados de la SVZ postnatal ha sido estudiado previamente en el laboratorio. Los lotes comerciales de IFN γ que hemos utilizamos para nuestros experimentos con animales han sido testados previamente en estos cultivos para comprobar que la citocina comercial es activa. El test consiste en analizar la proliferación y la expresión de diferentes marcadores fenotípicos mediante inmunofluorescencias en cultivos primarios heterogéneos de la SVZ después del tratamiento con IFN γ durante varios días.

En estos cultivos primarios tratados con IFN γ observamos:

- 1) Que se reduce de forma significativa el número de células que incorporan BrdU respecto al control, indicando que la proliferación celular está reducida (figura R1A-B).
- 2) La población de células Nestina+, que marca progenitores en diferentes estados de diferenciación, se reduce significativamente después del tratamiento (figura R1A-B).
- 3) El número de células GFAP+, astrocitos y NSCs, no se ve alterada ante el tratamiento (figura R1A-B).
- 4) La población de progenitores oligodendrogliales, células NG2+, no se ve alterada por el tratamiento (figura R1A-B).
- 5) La población de neuroblastos (células β III Tubulina+) muestra un incremento significativo (figura R1A-B).



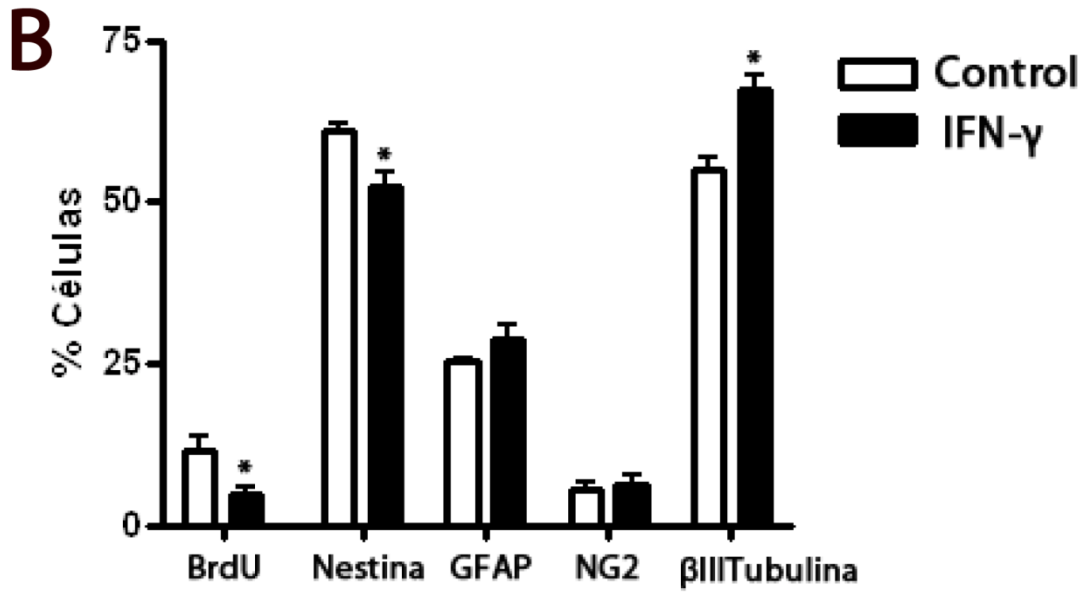


Figura R1. Efecto del IFN γ en cultivos primarios de la SVZ postnatal. **A:** Microfotografías representativas de los distintos marcadores utilizados. Nótese como la población celular BrdU+ y Nestina+ se encuentra reducida con el tratamiento de IFN γ respecto a sus controles; mientras que la población β III Tubulina+ se ve incrementada significativamente con la presencia IFN γ . Las poblaciones celulares GFAP+ y NG2+ no se ven alteradas por la citocina. En azul se observan todos los núcleos celulares marcados con Hoescht. **B:** Histograma de columnas que representa el porcentaje de células de los distintos marcadores empleados respecto al número total de células. Barra de escala: 100 μ m. Control n=3; IFN γ n=3. Los datos están representados como porcentaje promedio \pm S.E.M. (error estándar de la media). Se representa: *: p<0,05.

2. Control de la administración intracerebroventricular (ICV) de citocinas

La administración continua de las citocinas se realizó mediante la administración de IFN γ mediante bombas de infusión osmótica (ALZET) en ratones de 8 semanas de edad (ver métodos). En la presente tesis vamos a llamar a este abordaje experimental: estudios de ganancia de función (a partir de ahora abreviado ganancia de IFN γ). Esta metodología, ya había sido previamente puesta a punto y validada en el laboratorio donde se ha desarrollado el presente proyecto. Es una técnica de carácter invasiva; la cánula que administra el contenido de la bomba de infusión se implanta ICV (ver esquema en la figura R2A) e induce una leve inflamación localizada y restringida al hemisferio ipsilateral a la operación (lugar de la administración), pero que no afecta al hemisferio contralateral. Para comprobar la inflamación inducida localmente, de manera sistemática, analizamos la expresión de IBA-1 mediante inmunofluorescencia en secciones histológicas de muestras cerebrales obtenidas de los animales implantados (vehículo o tratamiento). El IBA-1, también conocido como “Ionized calcium-binding adapter molecule 1”, es una proteína que marca de manera genérica microglía/macrófagos. Su expresión basal en el cerebro es muy leve e incrementa considerablemente cuando la microglía se encuentra activa, como sucede ante lesión y/o inflamación (Ito et al., 1998, 2001).

A modo de ejemplo, mostramos en la figura R2B como al final del experimento en animales tratados con vehículo hay un incremento de células IBA-1+ en el cortex del hemisferio ipsilateral, alrededor de la zona donde ha estado implantada la cánula. Sin embargo, el hemisferio contralateral de los animales tratados con vehículo muestra una expresión basal de IBA-1 o microglía resting (Ling y Wong, 1993). Cuando se analizan secciones de animales administrados con IFN γ el resultado es parecido: en el cortex del hemisferio ipsilateral se observan células de microglía activada alrededor de la zona de la cánula, mientras que en el hemisferio contralateral la expresión de IBA-1 es basal.

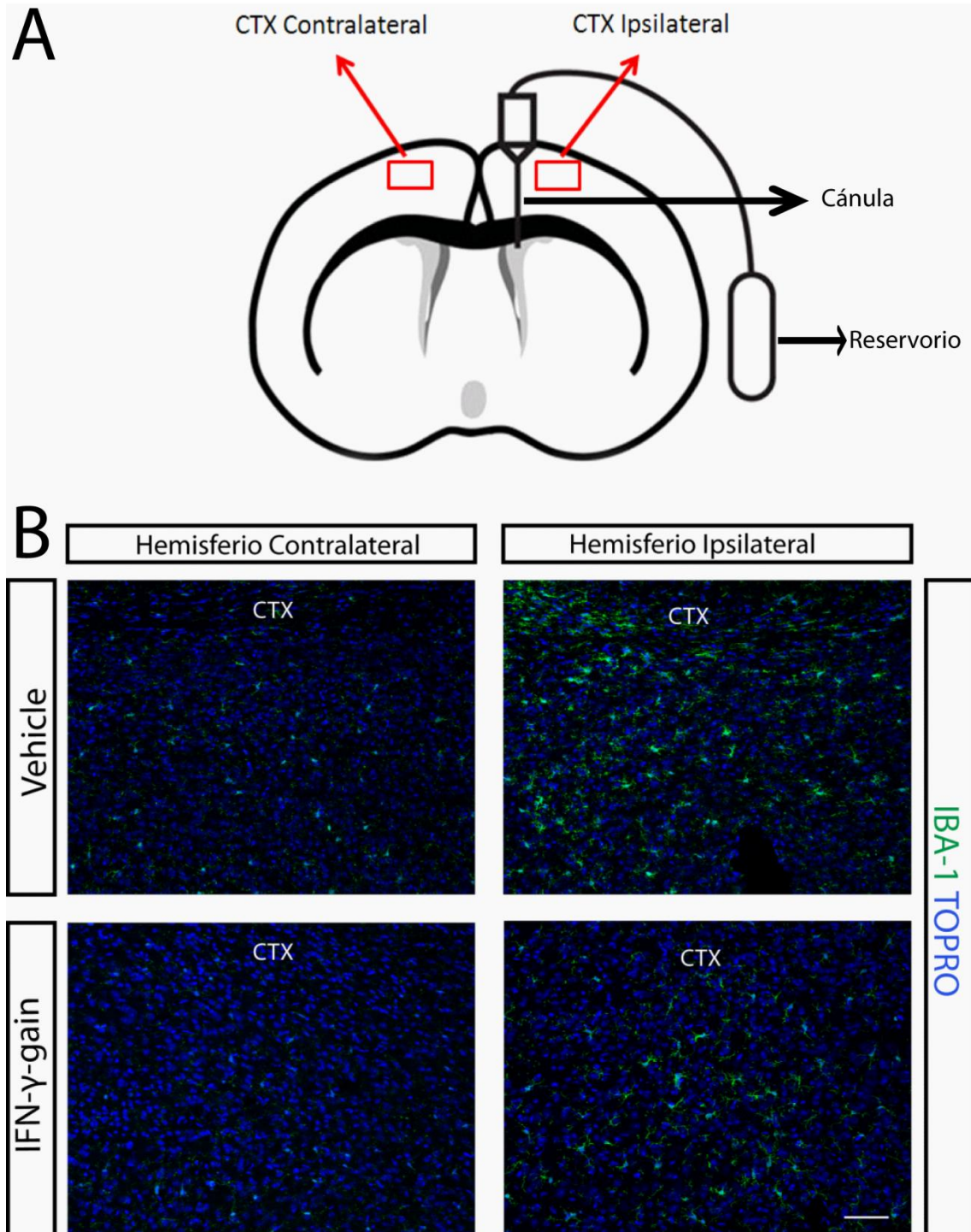
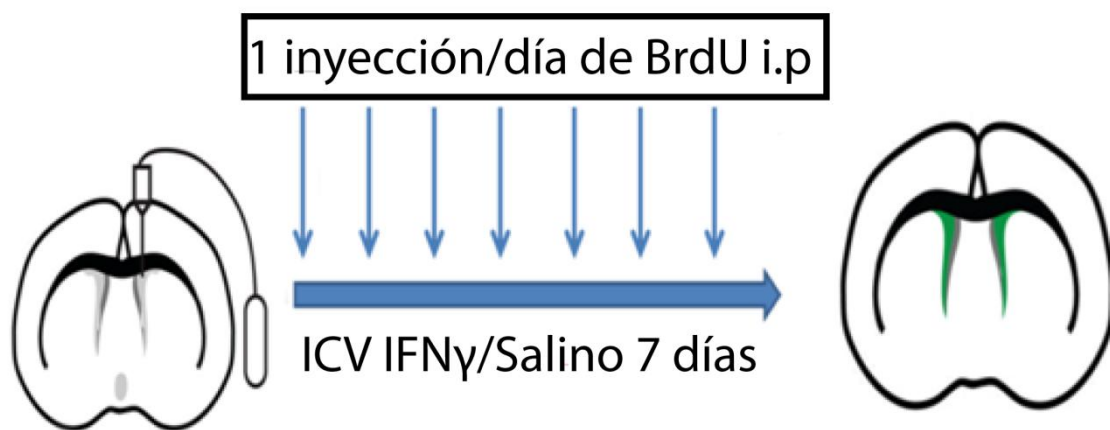


Figura R2. Expresión de IBA-1 en cerebros implantados con bombas de infusión para vehículo e IFN γ .
A: Esquema del modelo ICV donde observamos el reservorio que contiene el fármaco y la cánula que libera el fármaco ICV; con un cuadro rojo se indica la zona del córtex cerebral donde se tomaron las imágenes para el panel B de la presente figura. **B:** Las microfotografías muestran la inmunofluorescencia para IBA-1 (verde) sobre secciones histológicas de animales control y animales tratados con IFN γ . Nótese como el córtex del hemisferio ipsilateral, tanto de animales control como de animales tratados con IFN γ , presenta un incremento en la expresión de IBA-1 respecto a sus hemisferios contralaterales, donde los niveles basales de IBA-1 no se ven alterados. En azul se observa el marcaje nuclear general mediante TO-PRO3. CTX: Cortex. Barra de escala = 100 μ m.

3. Efecto del IFN γ sobre la proliferación celular de la SVZ *in vivo*

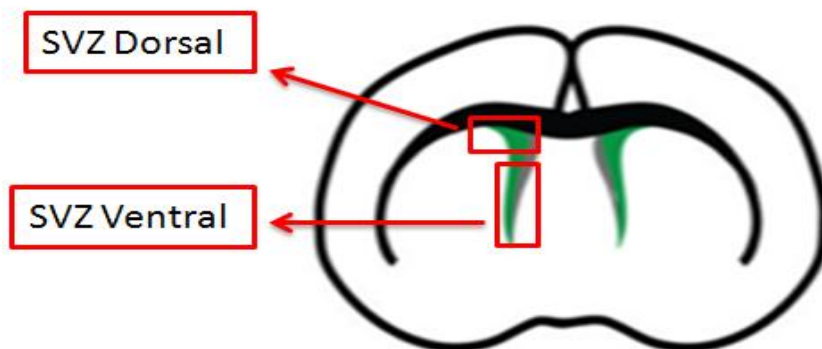
El primer paso que dimos fue el estudio del efecto que ejerce el IFN γ en el proceso de proliferación celular *in vivo* sobre el modelo de ganancia de IFN γ . Como se citó en la metodología, el BrdU es un análogo de la Timidina capaz de incorporarse al DNA de las células que se encuentran en la fase S del ciclo celular, por lo tanto, durante el modelo de ganancia de IFN γ a 7d (ver metodología) administramos diariamente una dosis de BrdU i.p (ver esquema 1).



Esquema 1. Representación del modelo de ganancia de IFN γ a 7 d

En el punto final del experimento los animales fueron perfundidos para su fijación y procesados para obtener muestras histológicas (ver métodos). Posteriormente, para detectar las células que habían estado en proliferación durante el tratamiento, se llevó a cabo la inmunofluorescencia para BrdU mediante anticuerpos específicos (ver metodología).

Es importante mencionar que la SVZ es un área extensa y se ha observado que no es una zona homogénea sino que muestra cierto *patterning* en el eje dorso-ventral y la localización de los progenitores determina su regulación y fenotipo final (Petreanu y Álvarez Buylla, 2002; Merkle et al., 2007, 2013; Lledó et al., 2008; Pérez-Asensio et al., 2013). Por ello, para nuestros análisis hemos subdividido la SVZ en dos áreas, la parte ventral y la región más dorsal de la SVZ, con el fin de poder determinar si el IFN γ es capaz de afectar de manera diferencial a ambas subregiones (ver esquema 2).



Esquema 2. Sección coronal del cerebro en la que se indica la región dorsal y ventral de la SVZ analizada

Al analizar la inmunofluorescencia para BrdU se observó que la presencia de células BrdU+ (figura R3A, verde) se ve severamente reducida en la región ventral de la SVZ en los animales tratados con IFN γ ; esto nos indica que la proliferación celular está comprometida ante la presencia del IFN γ (figura R3A parte izquierda del panel, control n=2; IFN γ n=4). Por otro lado, el análisis de las células BrdU+ (verde) en la región dorsal de la SVZ también manifestó una reducción de la proliferación celular ante la presencia de IFN γ (figura R3A parte derecha del panel). Ante esto podemos indicar que la proliferación celular en el SVZ se ve disminuida en toda su extensión ante la presencia de IFN γ . Las diferencias inducidas por el IFN γ sobre la proliferación celular tanto en la SVZ ventral como dorsal están representadas mediante los histogramas B-C (ventral y dorsal respectivamente) de la figura R3. Destacar, que para poder realizar convenientemente las comparaciones estadísticas tanto el grupo control como tratado deberían ser ampliados; si bien la tendencia observada indica de manera clara que el IFN γ reduce la proliferación en la SVZ adulta.

El análisis histológico de la SVZ mostró que los ratones de la cepa 129SV, utilizados en esta sección, muestran un LV muy cerrado (en comparación con otras cepas como C57BL/6J o C57BL/10J, y que veremos más tarde en la sección 2). Para su mejor observación hemos marcado mediante flechas el LV en las microfotografías de la presente sección.

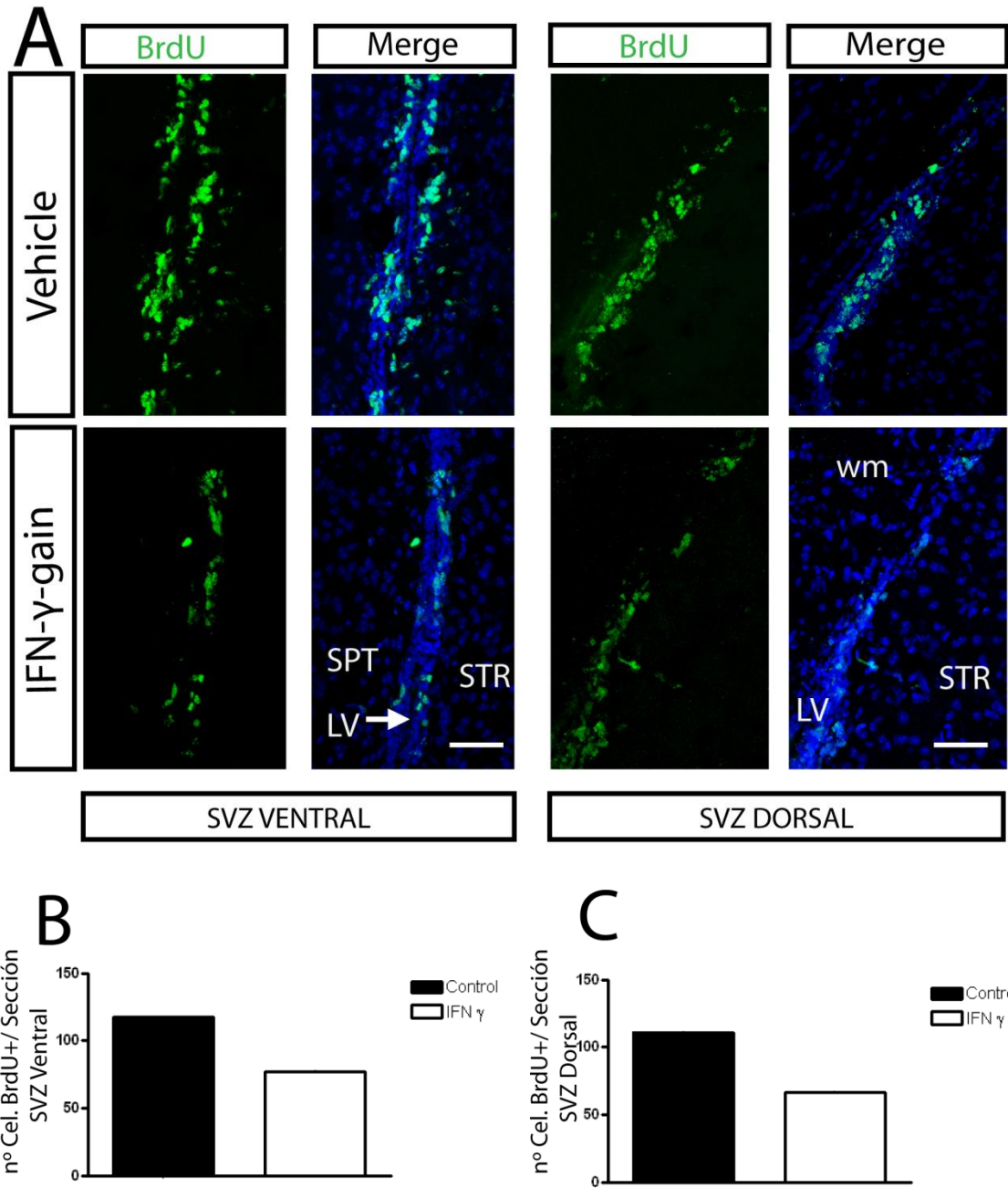


Figura R3. Inmunofluorescencia para BrdU en la SVZ en el modelo de ganancia de IFN γ a 7d. **A:** Las microfotografías representan el efecto del IFN γ sobre la proliferación celular (células BrdU+ en verde). Nótese como el IFN γ reduce el número de células BrdU+ tanto en la parte ventral como dorsal de la SVZ, cuando se compara con los animales tratados con vehículos. En azul se muestra los núcleos marcados con TO-PRO3. **B:** Representación gráfica del número de células BrdU+ por sección en la SVZ ventral. **C:** Representación gráfica del número de células BrdU+ por sección en la SVZ dorsal. STR: Estriado; LV: Ventrículo lateral; wm: Sustancia blanca; SPT: Séptum. Barra de escala 50 μ m. Control n=2; IFN γ n=4.

4. Acción del IFN γ sobre la población de neuroblastos (DCX+) de la SVZ

El siguiente paso que dimos fue examinar la población de neuroblastos de la SVZ en secciones coronales de animales en el modelo de ganancia de IFN γ a 7d. Para ello realizamos inmunofluorescencias para detectar la proteína Doblecortina (DCX). DCX es una proteína de citoesqueleto que se localiza en el citoplasma, neuritas y conos de crecimiento de neuroblastos y neuronas inmaduras de las zonas neurogénicas adultas (Nacher et al., 2001; Ribak et al., 2004).

El análisis de la inmunofluorescencia para DCX manifestó que la presencia de células DCX+ (figura R4A, rojo) se ve severamente reducida en la región ventral de la SVZ en los animales tratados con IFN γ . Este hecho nos indica que la población de neuroblastos de la SVZ está alterada ante la presencia del IFN γ (figura R4A parte izquierda del panel, control n=2; IFN γ n=4). Por otro lado, el análisis de las células DCX+ (rojo) en la región dorsal de la SVZ también manifestó una reducción en la población de neuroblastos de la SVZ ante la presencia de IFN γ (figura R4, parte derecha del panel). Ante estas observaciones podemos indicar que la población de neuroblastos en la SVZ se ve disminuida en toda su extensión ante la presencia de IFN γ . Las diferencias inducidas por el IFN γ sobre la población celular DCX+ tanto en la SVZ ventral como dorsal están representadas mediante los histogramas B-C (ventral y dorsal respectivamente) de la figura R4. Si bien, la tendencia es clara; los grupos experimental de animales control y tratados deberían ser ampliados para realizar las comparaciones estadísticas.

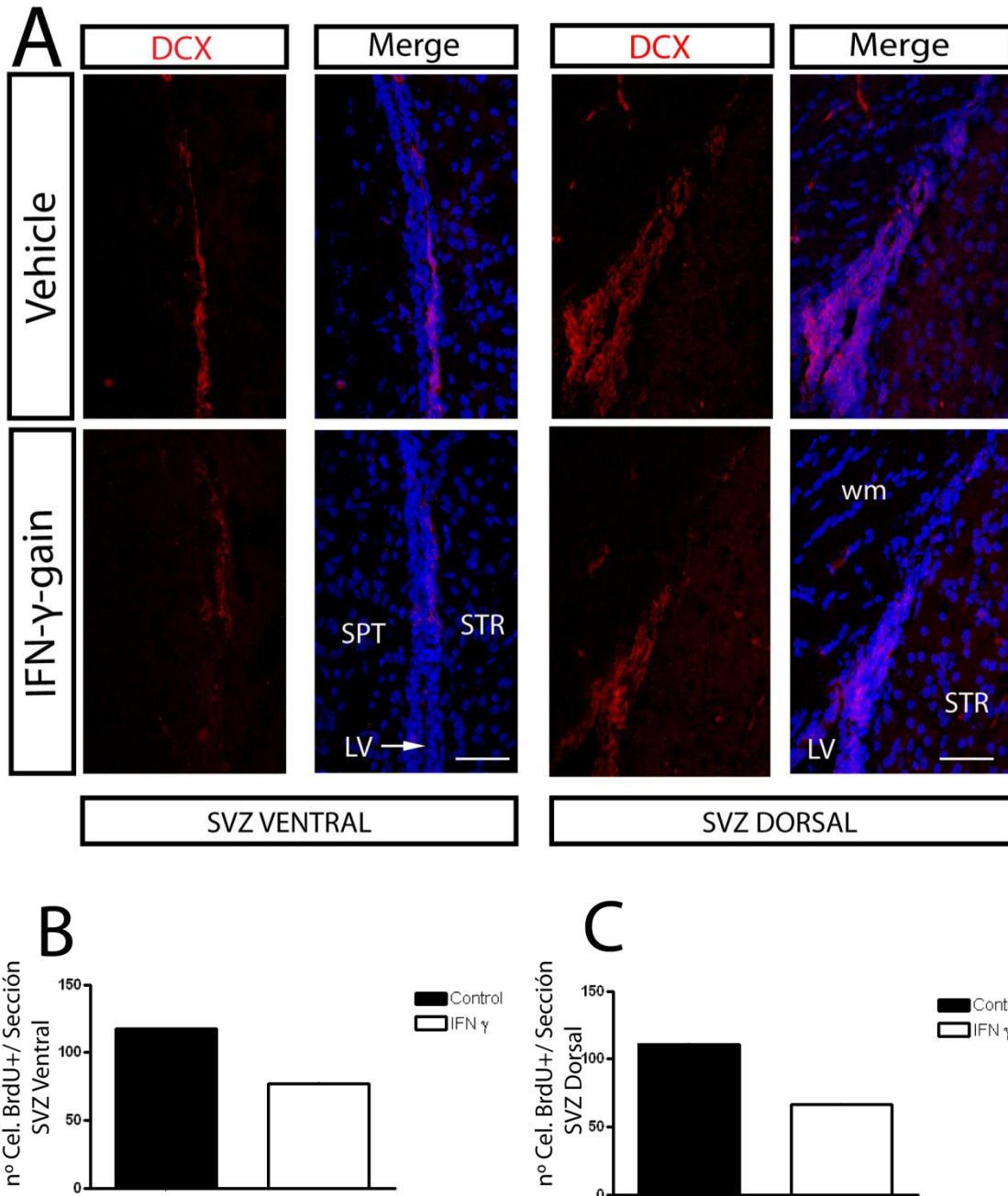
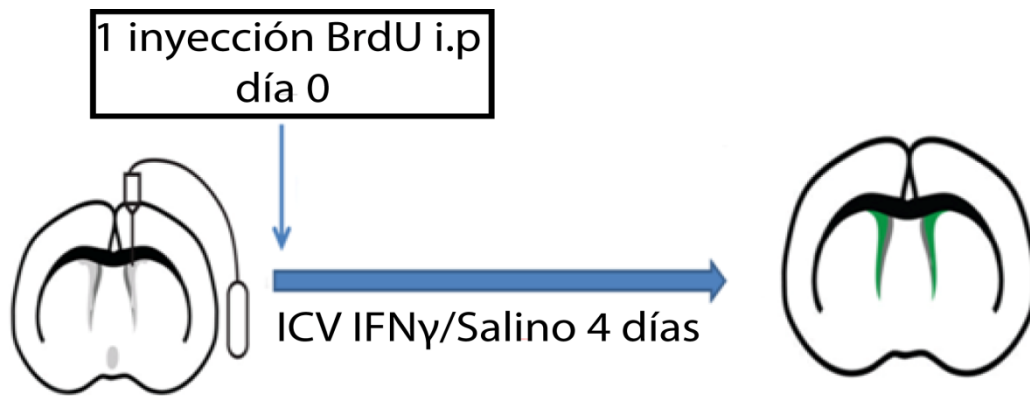


Figura R4. Inmunofluorescencia para DCX en la SVZ en el modelo de ganancia de IFN γ a 7d. A: Las microfotografías representan el efecto del IFN γ sobre la población de neuroblastos (células DCX+ en rojo). Nótese como el IFN γ reduce el número de células DCX+ tanto en la parte ventral como dorsal de la SVZ, cuando se compara los animales tratados con los vehículos. En azul se observa el marcaje de núcleos mediante TO-PRO3. **B:** Representación gráfica del número de células DCX+ por sección en la SVZ ventral. **C:** Representación gráfica del número de células DCX+ por sección en la SVZ dorsal. STR: Estriado; LV: Ventrículo lateral; wm: Sustancia blanca; SPT: Séptum. Barra de escala 50 μ m. Control n=2; IFN γ n=4.

5. Alteración de la diferenciación celular en la SVZ inducida por IFN γ *in vivo*

Las NSCs por su capacidad multipotente pueden dirigir su diferenciación celular hacia un linaje neuronal o glial (Doetsch et al., 1999). En condiciones fisiológicas el microambiente que proporciona el nicho neurogénico permite el equilibrio entre el estado indiferenciado de las NSCs, su potencial en la diferenciación celular y la determinación final del fenotipo que adquieren las células generadas en la SVZ (Doetsch et al., 1999; Merkle et al., 2007; Giachino et al., 2014).

En los apartados anteriores hemos mencionado que el IFN γ aumenta el número de neuroblastos en cultivos disociados de la SVZ (Pérez-Asensio et al., 2013). Mediante, el modelo animal de ganancia de función a varios días hemos determinado como el IFN γ produce una reducción tanto en la proliferación de progenitores, como en el número de neuroblastos. Dado que el modelo animal, en comparación al cultivo primario, es más dinámico y acumulativo, para poder discriminar el efecto antiproliferativo del posible efecto neurogénico del IFN γ *in vivo*, hemos llevado a cabo un nuevo grupo experimental de ganancia de IFN γ durante 4d y donde se administró BrdU una única vez y justo antes de realizar el tratamiento ICV con la citocina (ver métodos y esquema 3).



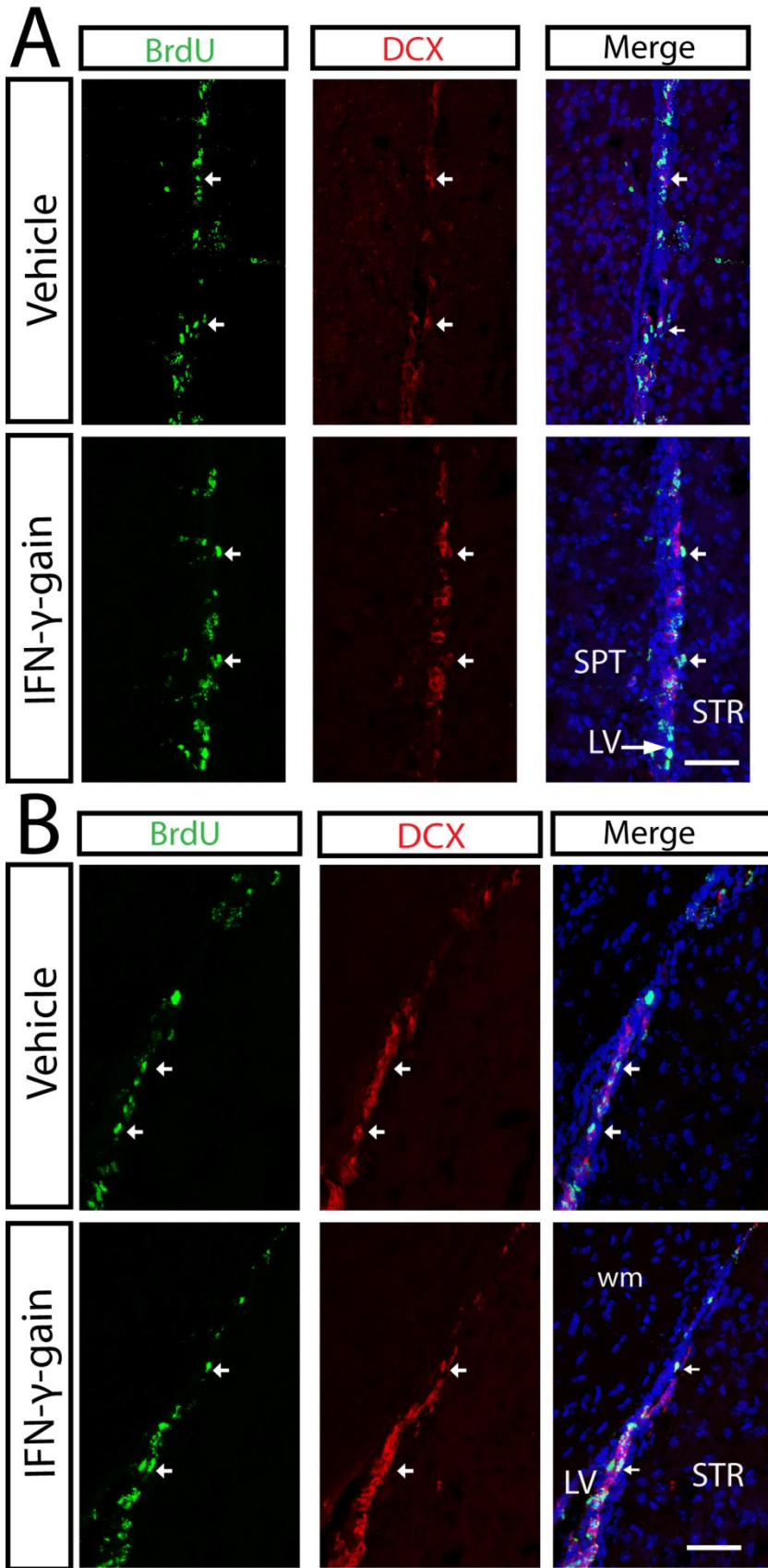
Esquema3. Esquema de ganancia de IFN γ a 4d

Resultados

Mediante este abordaje, pretendemos marcar la población celular en proliferación (BrdU+) antes del tratamiento con IFN γ , y poder así en que fenotipo neural se convierten éstas al final del experimento. Para analizar la diferenciación se realizaron dobles inmunofluorescencia para BrdU y marcadores fenotípicos conocidos: DCX para neuroblastos y Olig2 para oligodendrocitos. Por otro lado, se eligió el tiempo de tratamiento de cuatro días ya que es el que se ha descrito como necesario para la diferenciación neuronal en la SVZ adulta (Doetsch et al., 1999; Ponti et al., 2013).

5.1 La diferenciación neuronal ante la presencia de IFN γ

Al analizar la inmunofluorescencia para BrdU/DCX (figura R5A-B, verde/rojo) se observó como en la región ventral de la SVZ el porcentaje de células BrdU+, marcadas al inicio del experimento, que son DCX+ al final del experimento se ve incrementado en los animales tratados con IFN γ ; esto nos indica que la diferenciación neuronal de la SVZ está alterada ante la presencia del IFN γ (figura R5A, control n=2; IFN γ n=4). Por otro lado, el mismo análisis en la región dorsal de la SVZ también manifestó esta tendencia (figura R5B, control n=2; IFN γ n=4). Las diferencias observadas en esta diferenciación neuronal están representadas gráficamente por histogramas en la figura R5C y R5D para la región ventral y dorsal respectivamente. Ante estas observaciones podemos indicar que el IFN γ tiende a incrementar la diferenciación neuronal a lo largo de toda la SVZ. Tenemos pendiente ampliar ambos grupos experimentales para aplicar las comparaciones estadísticas, si bien la tendencia que observamos es clara.



Resultados

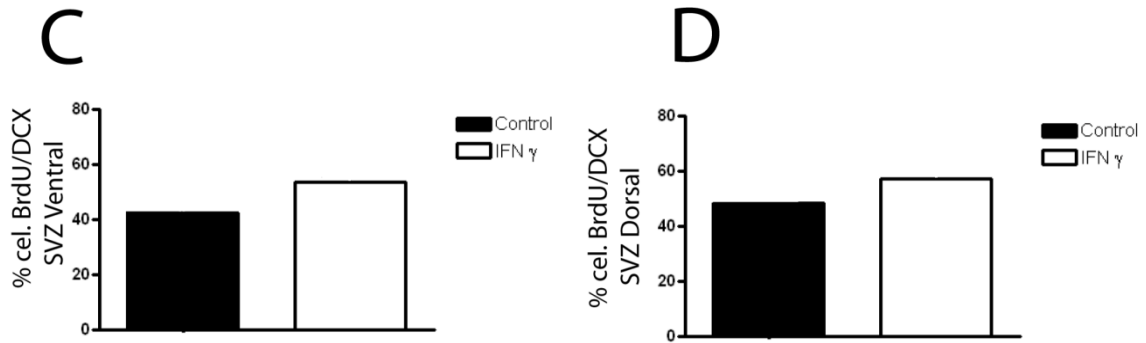


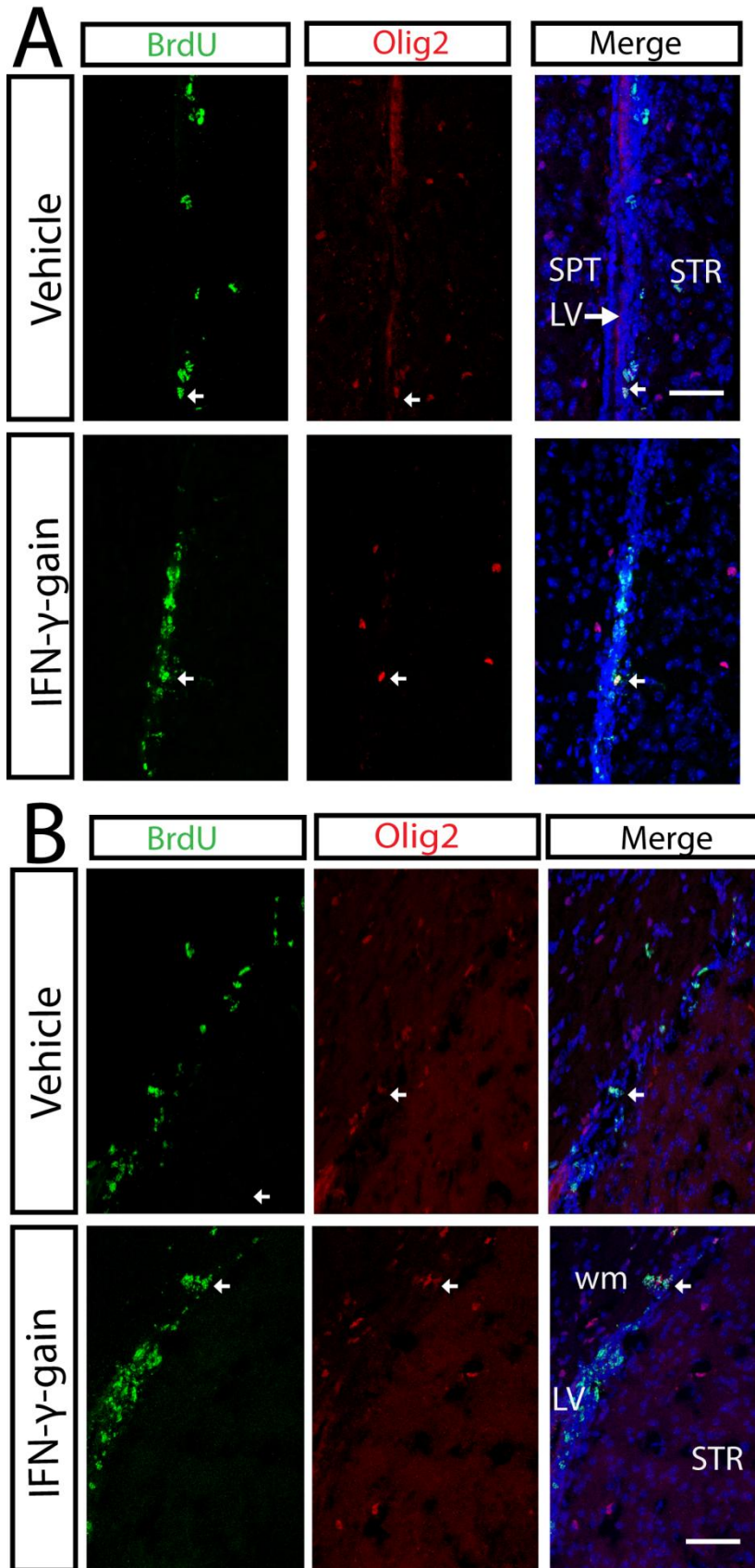
Figura R5. Inmunofluorescencia para BrdU y DCX en la SVZ en el modelo de ganancia de IFN γ a 4d. A-B: Las microfotografías representan el efecto del IFN γ sobre el número de células positivas para BrdU (verde) y DCX (rojo) en la SVZ ventral (A) y en la SVZ dorsal (B). Nótese como el IFN γ incrementa el número de células BrdU+/DCX+ tanto en la parte ventral como dorsal de la SVZ, cuando se compara los animales tratados con IFN γ respecto a sus vehículos. En azul se observa el marcaje nuclear para TO-PRO3. A modo de ejemplo se indican con una flecha algunas células BrdU+/DCX+. **C:** Representación gráfica del porcentaje de células BrdU+/DCX+ en la SVZ ventral. **D:** Representación gráfica del porcentaje de células BrdU+/DCX+ en la SVZ dorsal. STR: Estriado; LV: Ventrículo lateral; wm: Sustancia blanca; SPT: Séptum. Barra de escala 50 μ m. Control n=2; IFN γ n=4.

5.2 La diferenciación oligodendroglial ante la presencia de IFN γ

En condiciones fisiológicas las células madre de la SVZ adulta dirigen mayoritariamente su diferenciación hacia neuronas; no obstante, un porcentaje bajo de progenitores derivan hacia un linaje oligodendroglial (Doetsch, 2003b; Menn et al., 2006; Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009). La oligodendrogénesis en la SVZ parece que está regulada principalmente por el factor de transcripción Olig2, el cual puede expresarse en las células C promoviendo su diferenciación glial hacia nuevos precursores de oligodendrocitos (OPC) que serán los que generen los oligodendrocitos maduros (Hack et al., 2005; Menn et al., 2006; González-Pérez et al., 2009). Con el fin de dilucidar si el IFN γ interviene en la diferenciación oligodendroglial realizamos dobles inmunofluorescencias (BrdU/Olig2) en el grupo experimental administrados durante 4d.

Al analizar la inmunofluorescencia para BrdU/Olig2 (figura R6A-B, verde/rojo) se observó como el porcentaje de células BrdU+ que se convertían en Olig2+ al final del experimento y respecto al total de células BrdU+ no se ve alterado tras el tratamiento con IFN γ respecto al grupo control, tanto en la región ventral como dorsal de la SVZ adulta (figura R6A-B respectivamente, control n=8; IFN γ n=6).

Los histogramas representan como estadísticamente no hay diferencias significativas en el porcentaje de células BrdU+/Olig2+ entre animales control y tratados con IFN γ ni en la zona dorsal ni en la ventral de la SVZ (figura R6C y R6D respectivamente). Ante esto podemos indicar que el IFN γ no afecta a la diferenciación oligodendroglial de la SVZ adulta.



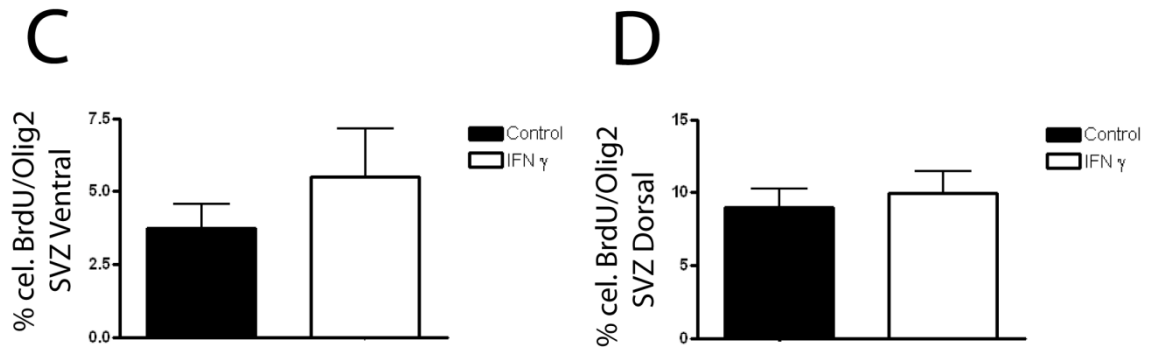
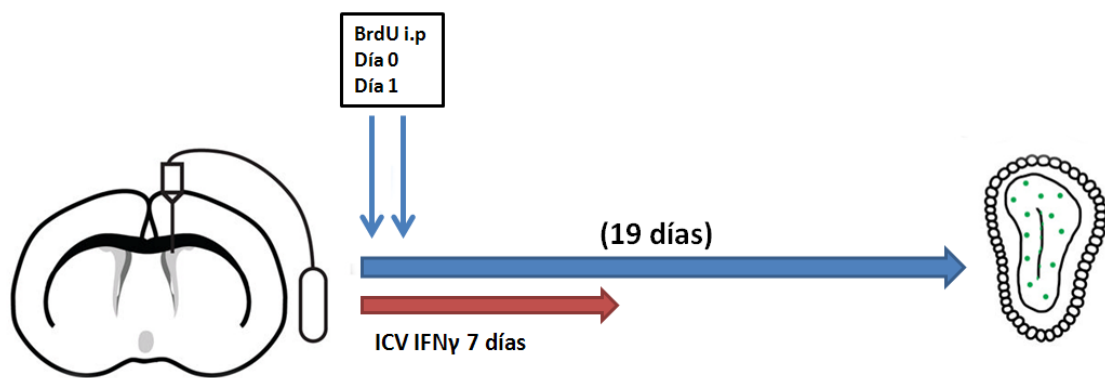


Figura R6. Inmunofluorescencia para BrdU y Olig2 en la SVZ en el modelo de ganancia de IFN γ a 4d. A-B: Las microfotografías representan el efecto del IFN γ sobre el número de células positivas para BrdU (verde) y Olig2 (rojo) en la SVZ ventral (A) y en la SVZ dorsal (B). Nótese como el IFN γ no altera el número de células BrdU+/Olig2+ tanto en la parte ventral como dorsal de la SVZ, cuando se compara los animales tratados con los vehículos. En azul se observa el marcador general de núcleos para TO-PRO3. A modo de ejemplo se indica con una flecha algunas células BrdU+/Olig2+. **C:** Representación gráfica del porcentaje promedio de células BrdU+/Olig2+ en la SVZ ventral. **D:** Representación gráfica del porcentaje promedio de células BrdU+/Olig2+ en la SVZ dorsal. STR: Estriado; LV: Ventrículo lateral; wm: Sustancia blanca; SPT: Séptum. Barra de escala 50 μ m. Control n=8; IFN γ n=6. Los datos están representados como promedio \pm S.E.M. (error estándar de la media).

6. El IFN γ provoca una disminución en la integración de nuevas neuronas en el OB.

Finalmente, analizamos si la acción del IFN γ repercute en la integración de las nuevas neuronas en su diana, el OB. Como hemos comentado anteriormente, la neurogénesis del eje SVZ-OB es un proceso de homeostasis tisular que finaliza con la integración de las células generadas en la SVZ en el OB, permitiendo un reemplazamiento continuo de interneuronas en el OB, y por lo tanto, regulando la plasticidad del mismo (Luskin, 1993; Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Álvarez-Buylla y Lim, 2004). Las células generadas en la SVZ tardan aproximadamente una semana en alcanzar el OB (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002), sin embargo, debe transcurrir entre 15-30 días para observar un fenotipo de interneurona madura en el OB (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002; Belluzzi et al., 2003). Por ello, para determinar las nuevas neuronas que llegan al OB se llevó a cabo un paradigma de administración de BrdU corto durante los dos primeros días en los animales de ganancia de IFN γ a 7d, y los cuales fueron sacrificados para su análisis 17 días después de la última administración de BrdU (ver esquema 4 y metodología). En este experimento, el análisis de dobles inmunofluorescencias BrdU/NeuN sobre secciones coronales de OB nos indicará el número de nuevas neuronas que se incorporan en éste, por lo tanto, nos permitirá evaluar la neurogénesis final en el OB.



Esquema 4. Esquema de ganancia de función de IFN γ para los estudios de integración neuronal en el OB.

Resultados

El análisis de la inmunofluorescencia para BrdU/NeuN (figura R7A, verde/rojo) determinó que la presencia de células BrdU⁺ se ve reducida significativamente en el OB de los animales tratados con IFN γ . Del mismo modo, la población celular BrdU⁺/NeuN⁺ también se ve reducida significativamente en el OB. En conjunto estos resultados nos indican que la integración de las nuevas neuronas en el OB está alterada ante la presencia del IFN γ (figura R7A, control n=6; IFN γ n=5). Las diferencias significativas están representadas gráficamente en los histogramas de la figura R7B-C.

Resultados

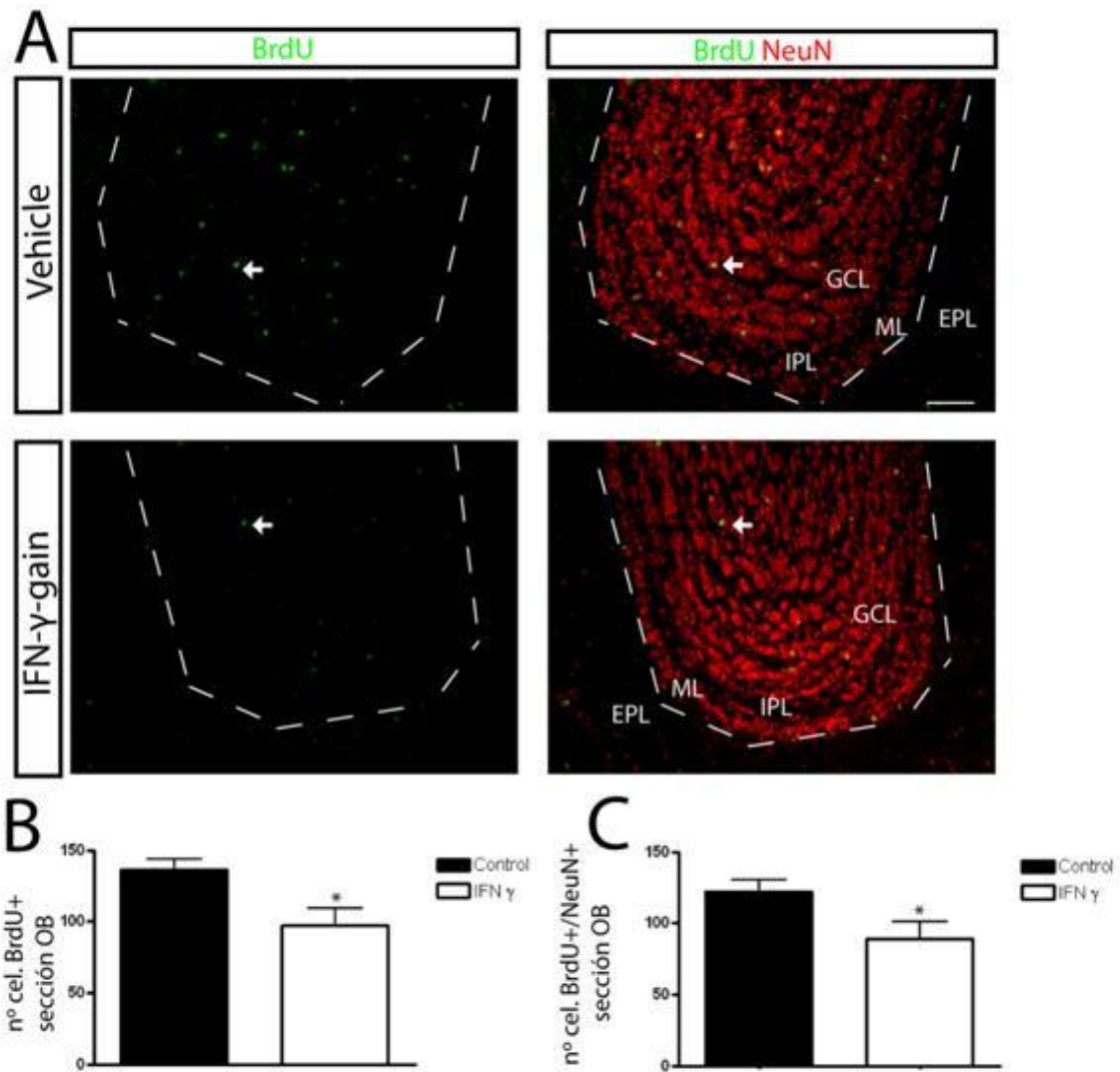


Figura R7. Inmunofluorescencia BrdU/NeuN en el OB del modelo de ganancia de IFN γ . **A:** Las microfotografías representan el efecto del IFN γ sobre el número de células BrdU+ y BrdU+/NeuN+ en el OB. Nótese como el IFN γ reduce significativamente el número de células BrdU+ y BrdU+/NeuN+ en el OB. Inmunofluorescencia de BrdU (verde), NeuN (rojo) y el marcador de núcleos TO-PRO3 (Azul). A modo de ejemplo se indican con una flecha las células BrdU+/NeuN+. **B:** Representación gráfica del número total de células BrdU+ por sección en el OB. **C:** Representación gráfica del número total de células BrdU+/NeuN+ por sección en el OB. EPL: External Plexiform Layer; ML: Mitral Layer; IPL: Internal Plexiform Layer; GCL: Granular Cell Layer. La barra de escala A 50 μ m. Control n=6; IFN γ n=5. Los datos están representados como promedio \pm S.E.M. Se representa: * : p<0,05.

RESULTADOS SECCIÓN II:

Efectos de la IL-10 sobre la neurogénesis normal en el cerebro adulto.

1. Efecto de la IL-10 sobre la proliferación celular de la SVZ *in vivo*

Experimentos del laboratorio determinaron como el receptor de IL-10 se encuentra expresado a lo largo de la pared del LV en las células ependimales y en los progenitores Nestina+ de la región dorsal de la SVZ, estando ausente en los progenitores de la zona ventral (Pérez-Asensio et al., 2013). Esto sugiere que la IL-10 podría tener un posible efecto únicamente sobre las progenitores de la SVZ dorsal (Pérez-Asensio et al., 2013). Para el estudio de la proliferación celular *in vivo* se estudió la incorporación de BrdU en el grupo de ganancia de IL-10 a 7 d. Al analizar la inmunofluorescencia para BrdU se observó que el número total de células BrdU+ en la SVZ dorsal no muestra diferencias entre animales tratados con IL-10 y sus controles, la representación gráfica de los valores obtenidos se muestra en la figura R8A (control n=4; IL-10 n=4; Pérez-Asensio et al., 2013). Además, de manera complementaria el análisis mediante inmunofluorescencia de la población celular PCNA (Antígeno Nuclear de Células en Proliferación, figura R8B, verde) no mostró tampoco diferencias significativas de ésta en la SVZ dorsal tras el tratamiento ICV con IL-10 respecto al control (figura R8B; control n=4; IL-10 n=4; Pérez-Asensio et al., 2013). Esto nos indica que la proliferación celular no está alterada ante la presencia del IL-10.

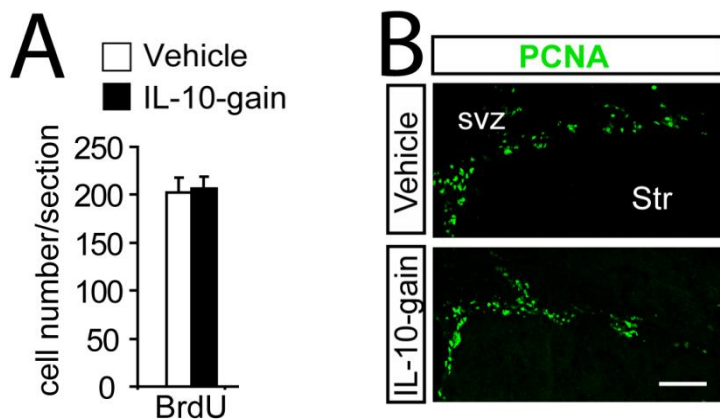


Figura R8. Efecto de la IL-10 sobre la proliferación *in vivo*. **A:** Representación gráfica del número de células BrdU+ por sección en la SVZ dorsal. **B:** Las microfotografías representan el efecto de la IL-10 sobre la población celular PCNA (verde). Nótese como la IL-10 no altera el número de células PCNA+ en la región dorsal de la SVZ,. SVZ: Zona Subventricular; Str: Estriado. Barra de escala 50 μ m. Control n=4; IL-10 n=4. Los datos están representados como promedio \pm S.E.M (Figura de Pérez-Asensio et al., 2013).

2. La IL-10 incrementa la población de progenitores y reduce la población de neuroblastos *in vivo*.

El primer paso que dimos para estudiar el efecto que ejerce la IL-10 sobre la neurogénesis endógena fue llevar a cabo un análisis histológico sobre secciones coronales de animales del grupo de ganancia de IL-10 a 7d.

Al analizar la inmunofluorescencia para Nestina se observó que la presencia de células Nestina+ (rojo) se ve incrementada significativamente en la región dorsal de la SVZ en los animales tratados con IL-10 (figura R9A; Pérez-Asensio et al., 2013). El marcador Nestina se encuentra expresado en las NSCs, en los progenitores de tránsito generados por las células B, así como en una población de neuroblastos (Doetsch et al., 1997), por lo tanto, la acción observada con la IL-10 sugiere que previene la diferenciación celular. Por otro lado, analizamos la población de neuroblastos presentes en la SVZ dorsal mediante inmunofluorescencias para dos marcadores específicos de estos: DCX y PSA-NCAM. El análisis de la inmunofluorescencia para DCX (rojo) mostró una reducción significativa de la población celular DCX+ en la región dorsal de la SVZ (figura R9A; Pérez-Asensio et al., 2013), a su vez, también observamos como el marcador PSA-NCAM se encuentra reducido tras el tratamiento con IL-10 (figura R9B; Pérez-Asensio et al., 2013), por lo tanto, con estos resultados podemos indicar que el tratamiento con IL-10 provoca una reducción en la población de neuroblastos presentes en la SVZ dorsal. Los valores obtenidos en las cuantificaciones celulares de Nestina, DCX y PSA-CAM se encuentran representadas gráficamente en la figura R9B (control n=6; IL-10 n=6).

Con el fin de dilucidar si la citocina afectaba directamente a la generación de los nuevos progenitores y neuroblastos, cuantificamos porcentaje de estas poblaciones celulares eran positivas para BrdU sobre el mismo grupo experimental. El análisis de la inmunofluorescencia Nestina/BrdU muestra un incremento significativo en el porcentaje de células doblemente positivas en la SVZ (figura R9C; Pérez-Asensio et al., 2013). Por otro lado, el análisis de la inmunofluorescencia DCX/BrdU muestra una reducción significativa del porcentaje de células doble positivas, indicando una reducción de los nuevos neuroblastos generados en la SVZ (figura R9C; Pérez-Asensio et al., 2013). Estas diferencias inducidas por la IL-10 en las poblaciones celulares

Resultados

Nestina+/BrdU+ y DCX+/BrdU+ están representadas en el gráfico R9C (control n=6; IL-10 n=6).

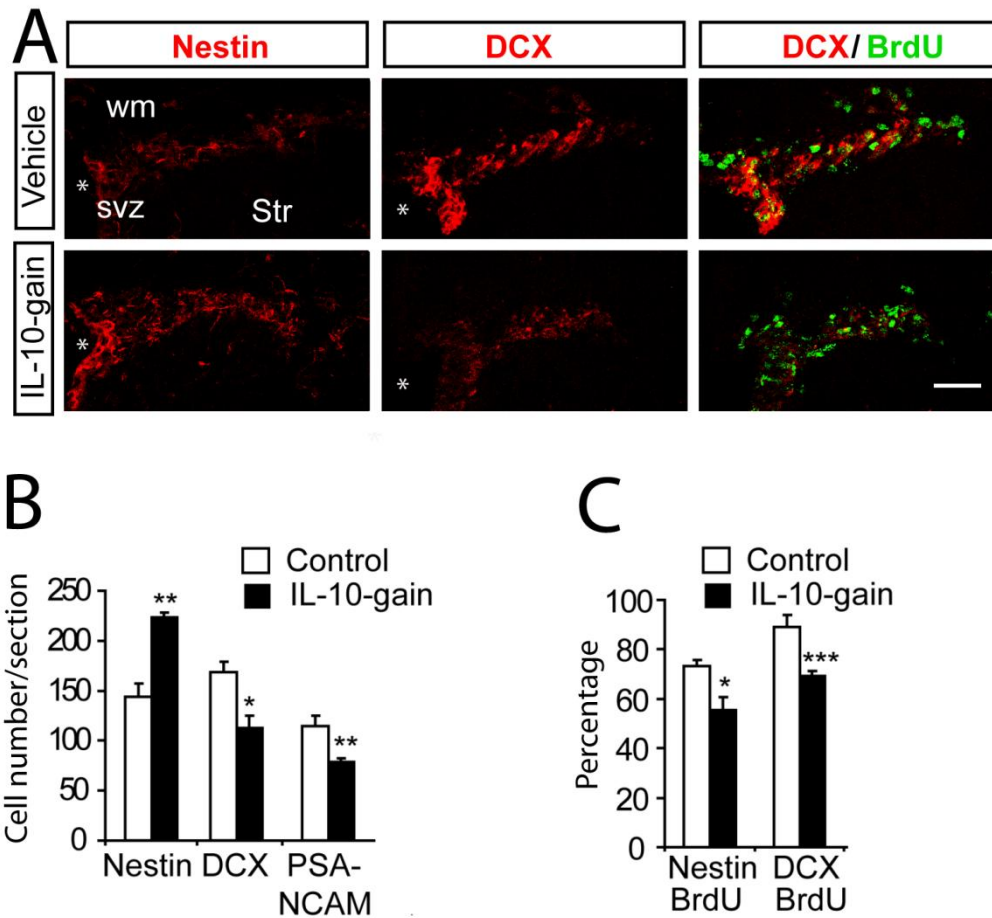


Figura R9. La IL-10 incrementa la población de progenitores y reduce la población de neuroblastos *in vivo*. **A:** Las microfotografías representan el efecto de la IL-10 en la población celular Nestina y DCX. Nótese como la IL-10 incrementa el número de células Nestina+ y reduce el número de células DCX+ en la SVZ dorsal. Nótese como la población BrdU+ (verde) no varía. **B:** Representación gráfica del número de células positivas para cada uno de los marcadores por sección en la SVZ dorsal. **C:** Representación gráfica del porcentaje de células doblemente positivas Nestina/BrdU y DCX/BrdU en la SVZ dorsal respecto al control. Nótese como esta colonia de ratones (C57BL/6J) presenta un LV (* en las microfotografías) más abierto en comparación con los de la colonia 129SV anteriormente comentados. wm: Sustancia blanca; SVZ: Zona Subventricular; Str: Estriado. Barra de escala 50 μ m. Control n=6; IL-10 n=6. Los datos están representados como promedio \pm S.E.M. Se representan: *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001 (Figura de PérezPérez-Asensio et al., 2013).

3. La SVZ restablece las poblaciones celulares tras el cese de la acción de la IL-10

El siguiente paso que dimos fue dilucidar si una vez finalizada la estimulación con IL-10 la SVZ sería capaz de restablecer sus poblaciones celulares. Para ello estudiamos histológicamente la SVZ dorsal dos semanas después de cesar el tratamiento ICV de IL-10 durante 7 días.

Al analizar la inmunofluorescencia para Nestina se observó que la presencia de células Nestina+ (figura R10A, verde) en la SVZ dorsal era igual entre los animales tratados con IL-10 y los controles (figura R10A; Pérez-Asensio et al., 2013). Por otro lado, tras el análisis de la inmunofluorescencia para DCX se observó que la presencia del número de células DCX+ (figura R10A, rojo) en la SVZ dorsal no muestra diferencias significativas entre los animales tratados con IL-10 y los controles (figura R10A; Pérez-Asensio et al., 2013). Los valores de Nestina y DCX los expresamos gráficamente en la figura R10B (control n=5; IL-10 n=5, Pérez-Asensio et al., 2013).

En conjunto estos resultados indican que los niveles de IL-10 son capaces de estimular la SVZ, si bien tras el cese de su actividad se restablecen los parámetros normales de la neurogénesis endógena.

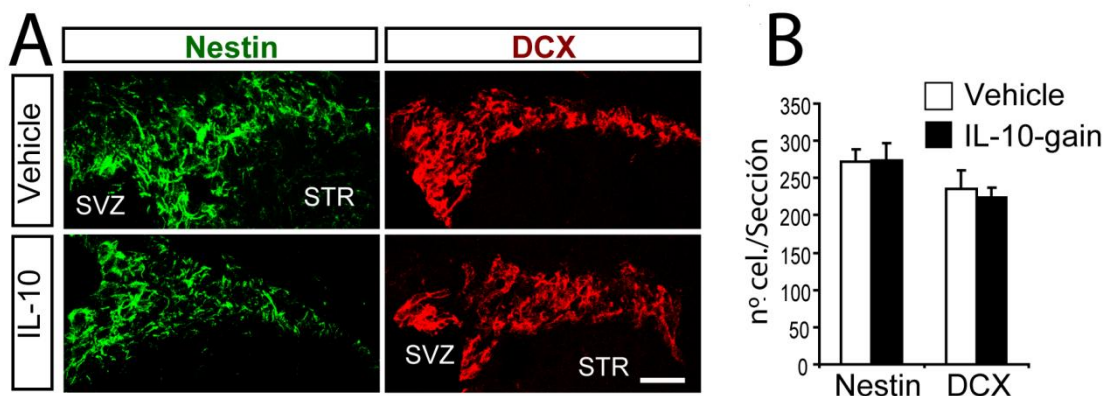


Figura R10. La SVZ recupera la normalidad tras el cese de la actividad de la IL-10. A: Las microfotografías representan la recuperación de los valores normales de Nestina (verde) y DCX (rojo), dos semanas después del cese de la actividad IL-10 en la SVZ dorsal. B: Representación gráfica del número de células positivas para cada uno de los marcadores por sección en la SVZ dorsal. SVZ: Zona Subventricular; Str: Estriado. Barra de escala 100 μ m. Control n=5; IL-10 n=5. Los datos están representados como promedio \pm S.E.M (Figura de Pérez-Asensio et al., 2013).

4. Efecto de la IL-10 en la diferenciación neuronal y oligodendroglial

Con intención de conocer qué efecto ejercía la IL-10 sobre la diferenciación celular de los progenitores de la SVZ *in vivo*, se realizaron análisis de diferenciación celular similares a los explicados en el punto 5 de la sección anterior, donde marcamos las células en proliferación (BrdU+) antes del tratamiento ICV con la citocina correspondiente.

Al analizar la inmunofluorescencia para BrdU y DCX se observó que el porcentaje de células BrdU+/DCX+ respecto al número total de células BrdU+ se ve reducido significativamente en la región dorsal de la SVZ de los animales tratados con IL-10; esto nos indica que la diferenciación neuronal está alterada ante la presencia del IL-10 (figura R11; control n=5; IL-10 n=5; Pérez-Asensio et al., 2013). Por otro lado, al analizar la inmunofluorescencia para BrdU y Olig2 no se observaron alteraciones en el porcentaje de células BrdU+/Olig2+ respecto al número total de células BrdU+ indicando que la diferenciación oligodendroglial no está alterada por la IL-10 (figura R11; control n=5; IL-10 n=5; Pérez-Asensio et al., 2013). Con estos resultados podemos concluir que la IL-10 afecta negativamente a la diferenciación neuronal y no altera la diferenciación oligodendroglial.

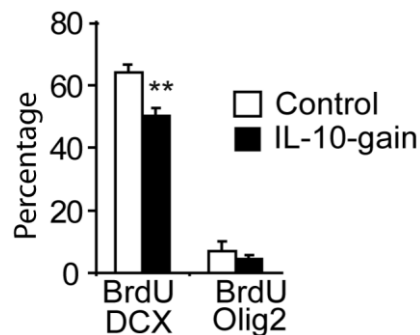


Figura R11. Efecto de la IL-10 en la diferenciación neuronal y oligodendroglial. Representación gráfica del porcentaje de células doblemente positivas BrdU/DCX y BrdU/Olig2 en la SVZ dorsal. Control n=5; IL-10 n=5. Los datos están representados como promedio \pm S.E.M. Se representa: **: $p < 0,01$ (Figura de Pérez-Asensio et al., 2013).

5. La ausencia de IL-10 altera la neurogénesis endógena de la SVZ

Los resultados obtenidos con los abordajes experimentales de ganancia de función sugieren que la citocina IL-10 tiene un papel importante en la regulación de la neurogénesis endógena. Para apoyar aún más el papel de la IL-10 como regulador en la neurogénesis de la SVZ, el siguiente paso que dimos fue analizar la SVZ de animales deficientes para IL-10.

Al analizar la inmunofluorescencia para Nestina en los animales deficientes para IL-10 se observó que la presencia de células Nestina⁺ (rojo) se ve reducida significativamente en la región dorsal de la SVZ de estos animales en comparación con los animales salvajes (figura R12A; Pérez-Asensio et al., 2013). Por otro lado, al analizar la inmunofluorescencia de DCX se observó que la presencia de células DCX⁺ (rojo) se ve incrementada significativamente en la región dorsal de la SVZ en los animales deficientes para IL-10 en comparación con los animales salvajes (figura R12A; Pérez-Asensio et al., 2013). Estos resultados nos indican que la ausencia de IL-10 también altera la neurogénesis endógena de la SVZ, provocando efectos opuestos a los obtenidos con el modelo de ganancia de función (figura R12A, control n=6; IL-10 n=6). Ante estas observaciones estudiamos los fenómenos de diferenciación celular en la SVZ dorsal de animales deficientes para la IL-10 con la metodología expuesta anteriormente. Al analizar la inmunofluorescencia para BrdU/DCX observamos como el porcentaje de células BrdU⁺/DCX⁺ respecto al total de células BrdU⁺ se encuentra incrementado significativamente ante la ausencia de IL-10; esto nos indica que la deficiencia de IL-10 incrementa la diferenciación neuronal (ver representación gráfica en figura R12B; control n=6; IL-10 n=6; Pérez-Asensio et al., 2013). Por otro lado, el análisis de la diferenciación oligodendroglial mediante doble inmunofluorescencia contra BrdU/Olig2 no manifestó diferencias significativas en el porcentaje de nuevos oligodendrocitos generados en la SVZ dorsal (células BrdU⁺/Olig2⁺) entre animales salvajes y deficientes para IL-10 (ver representación gráfica en figura R12B; n=6 control y n=6 para IL-10; Pérez-Asensio et al., 2013). Esto nos indica que la ausencia de IL-10 no afecta la diferenciación oligodendroglial.

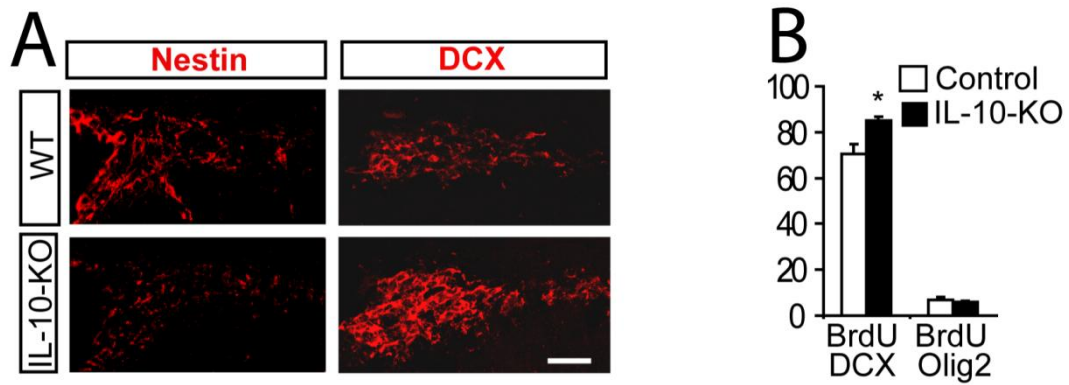


Figura R12. La ausencia de IL-10 afecta la neurogénesis endógena pero no afecta a la oligodendrogénesis de la SVZ. **A:** Las microfotografías representan el efecto de la ausencia de IL-10 en la población celular Nestina y DCX. Nótese como la ausencia de IL-10 reduce el número de células Nestina+ e incrementa el número de células DCX+ respecto al control. **B:** Representación gráfica del porcentaje de células doblemente positivas BrdU/DCX y BrdU/Olig2 en la SVZ dorsal de animales deficientes para IL-10 y animales control. Barra de escala 50 μ m. Control n=6; IL-10 n=6. Los datos están representados como promedio \pm S.E.M. Se representa *: $p < 0,05$ (Figura de Pérez-Asensio et al., 2013).

6. La IL-10 regula la integración de nuevas neuronas en el OB

El último paso que dimos fue investigar el efecto que ejerce la IL-10 sobre la integración de las nuevas neuronas generadas en la SVZ en el OB. Para ello realizamos el mismo abordaje experimental descrito en el punto 6 de la sección anterior.

Al analizar la inmunofluorescencia para BrdU/NeuN en el OB de los animales del modelo de ganancia de función para IL-10, se observó una reducción significativa de la población celular BrdU+ (figura R13A, verde) y BrdU+/NeuN+ (figura R13A, verde/rojo) sobre los cortes histológicos de OB, lo cual nos indica que la IL-10 actúa como regulador negativo de la neurogénesis SVZ-OB (figura R13A; Pérez-Asensio et al., 2013). Los valores de los contajes celulares están representados gráficamente en la figura R13B (control n=5; IL-10 n=5; Pérez-Asensio et al., 2013).

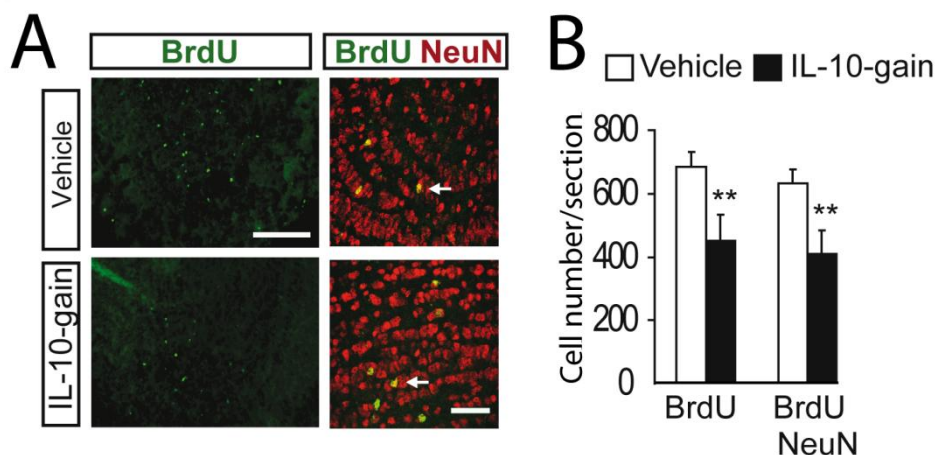


Figura R13. La IL-10 reduce la integración de nuevas neuronas en el OB. **A:** Las microfotografías representan el efecto de la IL-10 en la población celular BrdU y BrdU/NeuN en secciones de OB del modelo de ganancia de función. Nótese la reducción de la población BrdU+ y BrdU+/NeuN+ tras el tratamiento ICV de IL-10 respecto al control. A modo de ejemplo se señala una célula BrdU+/NeuN+ mediante una flecha blanca. **B:** Representación gráfica del número total de células positivas BrdU y BrdU/NeuN por sección de OB tras el tratamiento ICV de IL-10 y sus controles. Barra de escala en el panel superior, 100 μ m. Barra de escala en el panel inferior, 25 μ m. Control n=5; IL-10 n=5. Los datos están representados como promedio \pm S.E.M. Se representa: **: p<0,01 (Figura de Pérez-Asensio et al., 2013).

El mismo análisis sobre secciones histológicas del OB de los animales deficientes para la IL-10 muestra un incremento en la población celular BrdU+ y BrdU+/NeuN+ respecto a los animales salvajes (ver figura R14A). Los valores de los contajes celulares están representados gráficamente en la figura R14B (n=5 control y n=5 para IL-10; Pérez-Asensio et al., 2013).

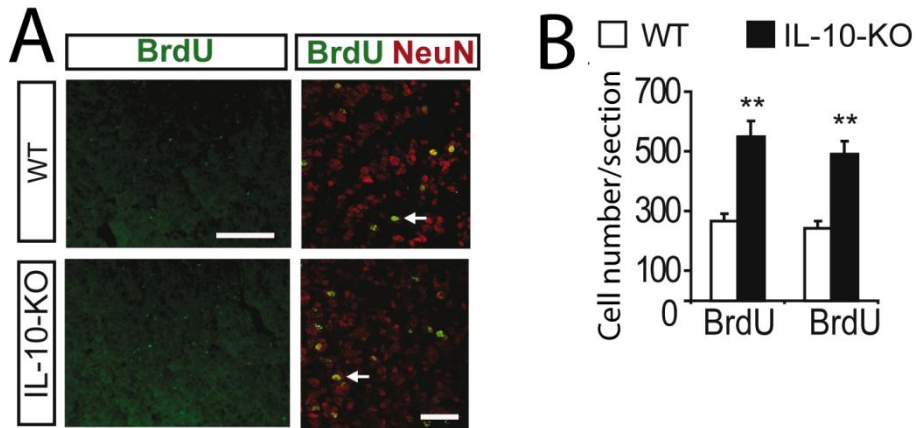


Figura R14. Los animales deficientes para la IL-10 tienen una mayor integración de neuronas en el OB.
A: Las microfotografías representan el efecto de la ausencia de IL-10 en la población celular BrdU y BrdU/NeuN en secciones de OB de animales deficientes para IL-10 y sus controles. Nótese el incremento de la población BrdU+ y BrdU+/NeuN+ en animales deficientes para IL-10 respecto al control. A modo de ejemplo se señala una célula BrdU+/NeuN+ con una flecha blanca. **B:** Representación gráfica del número total de células positivas BrdU y BrdU/NeuN por sección de OB de animales deficientes para IL-10 y sus controles. Barra de escala en el panel superior, 100 μ m. Barra de escala en el panel inferior, 25 μ m. Control n=5; IL-10 n=5. Los datos están representados como promedio \pm S.E.M. Se representa: **: $p < 0,01$ (Figura de Pérez-Asensio et al., 2013).

En conjunto estos resultados sugieren que los niveles de IL-10 son relevantes para la neurogénesis de la SVZ en el cerebro adulto.

DISCUSIÓN

Discusión

A lo largo de la presente tesis doctoral se han introducido los aspectos más relevantes en cuanto a la regulación de la neurogénesis del eje SVZ-OB. Actualmente se conocen multitud de factores, intrínsecos y extrínsecos, capaces de regular los procesos de proliferación y diferenciación de las NSCs y sus progenitores albergados en la SVZ. En la presente tesis doctoral nos hemos centrado en el estudio de las citocinas como moléculas reguladoras de la neurogénesis en condiciones fisiológicas.

Por definición, las citocinas son moléculas que participan en la comunicación y activación celular. Hace ya más de una década, los estudios *in vivo* realizados por el grupo de Monje et al., 2003 determinaron como la inflamación, producida por la administración sistémica de LPS, reducía drásticamente la población BrdU+/DCX+ del GD del hipocampo y, por lo tanto, reducía la neurogénesis endógena. ¿Qué moléculas eran responsables de dicho fenómeno? En el mismo trabajo citado anteriormente, determinaron que el tratamiento de animales con LPS induce un incremento de citocinas proinflamatorias que deben ser las responsable del efecto antineurogénico ya que el tratamiento con indometecina, un AINE, revierte el efecto antineurogénico del LPS. Hilando más fino, describieron como la exposición de IL-6 reducía un 50% la neurogénesis sobre cultivos de progenitores hipocampales respecto a la situación control. Dichos estudios apoyaban los análisis previos realizados sobre animales transgénicos que sobreexpresan IL-6, donde se mostró una reducción de la neurogénesis hipocampal en dichos animales transgénicos (Vallieres et al., 2002). En el estudio de de Monje et al., 2003, también determinaron como la exposición del cultivo de progenitores hipocampales a TNF α reducía la neurogénesis hipocampal drásticamente (Monje et al., 2003). Dichas evidencias sugieren y apoyan la idea de que las citocinas intervienen en la regulación de la neurogénesis endógena. Posteriormente, empleando modelos animales deficientes en cada uno de los receptores (TNF-R1 y TNF-R2) y animales deficientes en los dos receptores (TNF-R1/TNF-R2), determinaron como la señalización de la citocina a través del TNF-R1 provoca la reducción de la proliferación celular y la neurogénesis en el cerebro adulto, mientras que la señalización a través de TNF-R2 está implicada en la supervivencia celular (Iosif et al., 2006). En otros estudios *in vivo*, determinaron que la citocina proinflamatoria IL-1 β también participa en la regulación de la neurogénesis endógena. En éstos, mediante un modelo de ganancia de función, determinaron que tras la

Discusión

administración ICV de la citocina IL-1 β se produce una reducción de la proliferación celular en el hipocampo adulto (Koo y Duman, 2008). A su vez, determinaron como el bloqueo del receptor de IL-1 β , IL-1RI, empleando la administración de un inhibidor o bien utilizando animales deficientes en IL-1RI, revertía el efecto producido por la citocina, sugiriendo que esta citocina también interviene en la regulación de la proliferación celular en condiciones fisiológicas (Koo y Duman, 2008). Más adelante, el trabajo de Gómez-Nicola et al., 2011 observó como la citocina IL-15 se expresa en las células GFAP+ de la SVZ, mientras que la subunidad del receptor de IL-15 (IL-15R α) se expresa en las células Nestina+ de la SVZ. Mediante el estudio de animales deficientes en la citocina IL-15, observaron en éstos una menor incorporación de BrdU y una reducción en el número de neuroblastos (células DCX+) en la SVZ. Por otro lado, mediante la administración ICV de IL-15, observaron una recuperación del fenotipo de los animales deficientes para IL-15, sugiriendo que la IL-15 interviene en condiciones fisiológicas en la regulación de la proliferación y diferenciación celular de la SVZ (Gómez-Nicola et al., 2011). Además, observaron que las neuroesferas obtenidas de ratones deficientes en IL-15 presentaban una menor auto-renovación y proliferación celular respecto a los animales WT, sugiriendo que la IL-15 en condiciones fisiológicas participa en la auto-renovación celular de las NSCs (Gómez-Nicola et al., 2011).

En el presente trabajo experimental hemos estudiado las acciones del IFN γ y la IL-10 sobre la neurogénesis endógena normal de la SVZ. Para ello hemos empleado estudios histológicos sobre modelos animales de pérdida y ganancia de función. Los resultados obtenidos indican que ambas moléculas tienen una acción sobre los progenitores neurales de este nicho neurogénico en el cerebro adulto.

1. El IFN γ como molécula antiproliferativa en la SVZ adulta

En nuestros ensayos mediante el análisis de la incorporación de BrdU en un modelo de ganancia de función de IFN γ , en el que se administra ICV la citocina durante 7 días, se muestra como ésta inhibe la proliferación de los progenitores a lo largo de toda la extensión de la SVZ. Previamente, en el laboratorio se determinó, en cultivos primarios de la SVZ postnatal y mediante la incorporación de BrdU, que la administración de IFN γ (50 ng/ml) reduce la proliferación celular.

Varios autores han descrito como el IFN γ muestra un efecto antiproliferativo sobre cultivos de progenitores de la SVZ. De este modo, se ha determinado como el tratamiento con IFN γ provoca una reducción en la incorporación de BrdU o timidina tritiada y en el marcador de ciclo celular Ki67 en cultivos de neuroesferas embrionarias o postnatales tempranas (Ben-Hur et al., 2003; Mäkelä et al., 2010). El tratamiento con IFN γ de neuroesferas obtenidas de SVZ de ratón adulto también provoca la reducción en la generación de nuevas neuroesferas (Wong et al., 2004; Li et al., 2010). Por otro lado, los análisis histológicos de la SVZ de animales deficientes para IFN γ mostraron un incremento en la incorporación de BrdU respecto a los animales salvajes (Li et al., 2010). Los resultados de la presente tesis doctoral muestran, mediante un modelo de ganancia de función de IFN γ , que dicha citocina tiene también un efecto antiproliferativo *in vivo* ya que en estos animales se observa una tendencia a reducir la incorporación de BrdU a lo largo de toda la SVZ. En conjunto, podemos concluir que el IFN γ es un regulador negativo de la proliferación celular en la SVZ adulta.

Sin embargo, ¿Se trata de un efecto directo? ¿Cuál es el mecanismo molecular implicado en dicho fenómeno? Actualmente conocemos como las subunidades IFN γ R1 y IFN γ R2, que componen el receptor de IFN γ , están presentes en los progenitores Nestina+ de la SVZ (Mäkelä et al., 2010; Walter et al., 2011); por otro lado, se ha descrito que el IFN γ también puede actuar a través del Receptor 2 del complemento que está ampliamente representado en la SVZ adulta (Moriyama et al., 2011). Todo ello sugiere la posibilidad de un efecto directo por parte de la citocina sobre los progenitores de la SVZ. En este sentido, el trabajo de Li et al., 2010 realizó un abordaje experimental *in vitro* con el fin de determinar el posible efecto directo de la citocina sobre los progenitores neurales. Para ello realizaron un gradiente de diluciones celulares que alcanzaba la suspensión celular compuesta por una única célula.

Discusión

Posteriormente, analizaron el efecto del IFN γ en todas las concentraciones celulares, determinando un descenso en la formación de neuroesferas tras el tratamiento con IFN γ en todas las concentraciones celulares. Con esto Li et al., 2010 sugieren la eliminación de toda acción paracrina que pueda enmascarar el efecto del IFN γ , y por tanto un efecto directo del IFN γ sobre los progenitores neurales. Sin embargo, todavía cabe la duda sobre este fenómeno, ya que en condiciones fisiológicas las NSCs y los progenitores neurales de la SVZ tienen la capacidad de expresar receptores para otras citocinas y moléculas, así como producir multitud de citocinas que puedan actuar ante la presencia de IFN γ . En un futuro sería interesante discernir el efecto directo del IFN γ sobre los progenitores neurales

Los mecanismos moleculares que median la acción del IFN γ sobre los progenitores de la SVZ no están claramente caracterizados. La interacción entre la citocina y su receptor activa la vía de señalización JAK/STAT provocando la rápida fosforilación de STAT-1, factor de transcripción que se internaliza en el núcleo e interviene en la regulación de la expresión de distintos genes que intervienen en multitud de procesos como la respuesta inflamatoria (Bach et al., 1997). Ciertos autores han sugerido que la acción antiproliferativa de la citocina se debe al mantenimiento de la fase G1 del ciclo celular dependiente de la activación de STAT-1 (Lum et al., 2009). También ha sido implicada la proteína p21 en el efecto antiproliferativo mediado por esta citocina, ya que el tratamiento con IFN γ de cultivos de neuroesferas obtenidas de progenitores embrionarios provoca el incremento de los niveles de la proteína p21, mientras que el silenciamiento de dicha proteína con siRNA bloquea el efecto antiproliferativo producido por el IFN γ (Mäkelä et al., 2010). En otro estudio, se propone que podría ser p27 un mediador de la acción del IFN γ , ya que se ha observado una sobreexpresión de p27 en progenitores adultos de la SVZ de ratón tras el tratamiento con IFN γ (Lum et al., 2009). Por otro lado, ensayos de generación de neuroesferas obtenidas de animales deficientes para p27, muestran que la ausencia de dicha proteína provoca un incremento en el número de neuroesferas producidas (Li et al., 2009); mientras que la sobreexpresión de p27 reduce la proliferación celular en éstas (Li et al., 2009). Además, se ha observado un incremento gradual de la expresión de dicha proteína a lo largo del eje SVZ-OB, siendo mayor en el OB; y los autores sugieren que dicho incremento gradual permite controlar la proliferación celular SVZ-OB (Li et al., 2009).

Discusión

Por lo tanto, la bibliografía sugiere que el efecto antiproliferativo producido por el IFN γ se debe a la intervención de una serie de proteínas que regulan el ciclo celular. No obstante los mecanismos intracelulares de acción activados por el IFN γ no están totalmente definidos y en un futuro sería interesante descifrar las vías de señalización que median dichos efectos antiproliferativos en la SVZ.

2. El IFN γ en la diferenciación celular

Actualmente existen varios trabajos publicados sobre el efecto que ejerce IFN γ en cultivos neurales sobre la diferenciación neuronal, si bien, no todos ellos están en total consonancia. Abordajes experimentales utilizando un modelo de neuroesferas obtenidas de la SVZ adulta de ratón muestran como el IFN γ participa en la diferenciación neuronal (Wong et al., 2004; Zahir et al., 2009). De este modo, se ha determinado como el tratamiento de neuroesferas, obtenidas de la SVZ de ratón adulto, con 10 ng/ml de IFN γ provoca un incremento de células β III-Tubulina (neuroblastos). A su vez, en el mismo trabajo detectaron un incremento en el número y tamaño de neuritas de los nuevos neuroblastos generados en comparación al control (Wong et al., 2004). En el trabajo de Zahir et al., 2009 se muestra como el tratamiento de neuroesferas adultas, con 100 ng/ml de IFN γ , estimula la neurogénesis (células β III-Tubulina+) en el cultivo respecto al control. Además, en el mismo trabajo observan como la estimulación combinada de 100 ng/ml IFN γ con un agonista del AMPc endógeno, (dbcAMP 4mM) provoca un mayor incremento de la diferenciación neuronal en comparación con el efecto que ejerce el IFN γ por sí solo (Zahir et al., 2009). El efecto que ejerce el IFN γ sobre la diferenciación neural también ha sido estudiado sobre la línea celular C17.2 (progenitores neurales obtenidas de cerebelo neonatal de ratón) (Kim et al., 2007). En dicho trabajo, la estimulación del cultivo celular con dosis de 10 ng/ml y 100 ng/ml de IFN γ durante 7 días, provocaba el incremento del número de células β III-Tubulina+ en el cultivo. Por otro lado, en el laboratorio hemos observado como el tratamiento, a dosis de 50 ng/ml de IFN γ , en cultivos primarios de SVZ de rata postnatal produce un incremento del número de neuroblastos, a la par que se manifiesta una reducción en el número de células Nestina+ en dicho cultivo. Estas observaciones sugieren que la citocina favorece la diferenciación neuronal *in vitro*. En oposición a todas estas observaciones, Li et al., 2010 describen un efecto negativo del IFN γ sobre la neurogénesis. Los autores muestran como el tratamiento de IFN γ , a dosis de 50 ng/ml, sobre un cultivo de neuroesferas obtenidas de SVZ de ratón adulto y postnatal reduce la población de células β III-Tubulina+ respecto a los cultivos control. Además, los autores observan como se produce un mayor número de células β III-Tubulina+ en el cultivo de neuroesferas obtenidas de ratones deficientes para IFN γ (Li et al., 2010).

Discusión

¿A qué se debe dicha variabilidad observada en los resultados publicados hasta el momento? Analizando con mayor detalle estas publicaciones observamos diferencias metodológicas entre los distintos trabajos. En primer lugar, la variabilidad no se podría explicar por las diferentes dosis empleadas en los distintos abordajes experimentales descritos ya que se ha observado tanto un aumento como un decremento a dosis similares (Wong et al., 2004; Kim et al., 2007; Zahir et al., 2009, Li et al., 2010, observaciones del laboratorio).

Otro punto a tener en cuenta, son el modo de aplicación y el tiempo de tratamiento de la citocina en el cultivo primario. Por ejemplo, el grupo de Wong et al., 2004, Kim et al., 2007, Zahir et al., 2009 observaron un incremento en el número de neuroblastos en el cultivo y en sus abordajes experimentales los cultivos celulares estaban siempre en contacto con el IFN γ durante el transcurso de toda la etapa de diferenciación; en nuestros abordajes experimentales el cultivo primario también estuvo siempre en contacto con la citocina. Por el contrario, en el abordaje experimental llevado a cabo por el grupo de Li et al., 2010 se estimulan brevemente las neuroesferas con IFN γ y posteriormente se diferencian en un medio en ausencia de IFN γ , observando finalmente una reducción en el número de neuroblastos en el cultivo. En este sentido, es posible que los efectos observados entre diversos grupos de investigación puedan deberse a la presencia o ausencia de la citocina durante el proceso de diferenciación celular. Por ello, en un futuro sería interesante realizar paralelamente ensayos con presencia/ausencia de citocina durante todo el proceso de diferenciación y poder determinar si el efecto observado depende del modo de administración de la citocina. Por otro lado, es también razonable pensar que en función del estadio en el que obtengamos los progenitores neurales (embrionario, postnatal o adulto) existan distintos perfiles de expresión basal de citocinas, receptores, morfógenos, etc., que puedan afectar a la variabilidad observada. Sin embargo, al analizar la bibliografía este hecho no parece ser el factor responsable en la variabilidad observada de los resultados. En éstos, se ha detectado como el IFN γ es capaz de incrementar los neuroblastos del cultivo empleando progenitores adultos (Wong et al., 2004; Zahir et al., 2009), progenitores postnatales (nuestros resultados) o la línea celular C17.2 (Kim et al., 2007). Por otro lado Li et al, 2010 observan el efecto opuesto a todos los demás autores, y determinan un descenso en el número de neuroblastos empleando tanto

Discusión

progenitores postnatales como adultos (Li et al., 2010). Destacar que dado que el IFN γ tiene un fuerte efecto en la proliferación se deberían correlacionar los estudios de proliferación con los de diferenciación a la hora de sacar una conclusión en la observación final. En esta dirección, en nuestros abordajes experimentales *in vivo*, empleando un modelo de ganancia de función, mostramos como el IFN γ tiende a reducir la población final de células DCX+ (neuroblastos) a lo largo de toda la SVZ. Como previamente ya habíamos observado una fuerte reducción de la proliferación por el IFN γ *in vivo* en este modelo, esto nos podría enmascarar el posible efecto real en el fenómeno específico de diferenciación neuronal y la generación final de nuevas neuronas ante la presencia de IFN γ . Nuestros estudios de diferenciación neuronal *in vivo*, marcando los progenitores con BrdU con anterioridad al tratamiento con la citocina, nos ayudó a discernir ambos fenómenos e indicaron que la diferenciación neuronal estaba incrementada a lo largo de toda la SVZ ante la presencia del IFN γ ; mientras que la diferenciación oligodendroglial no sufría modificaciones. A pesar de esto, la integración de nuevas neuronas en el área diana (células BrdU+/NeuN+ en el OB) es menor en los animales administrados con IFN γ . Estos datos muestran que el efecto final que ejerce el IFN γ sobre la neurogénesis SVZ-OB es negativo, y observando nuestro resultados podemos indicar que la bajada en la proliferación celular de la SVZ es mucho más potente que el incremento en la diferenciación neuronal (células BrdU+/DCX+) producida en ésta, pudiéndose entender que el efecto neto final sea una reducción final en el OB, que proporcionalmente es menor al gran efecto antiproliferativo inducido por el IFN γ . En oposición a todas estas observaciones, Li et al., 2010 muestran que la incorporación de nuevas neuronas (BrdU+/NeuN+) en el OB de animales deficientes para IFN γ esta incrementada, si bien, los autores del trabajo limitan que la ausencia crónica de la citocina induce claramente la proliferación celular en la SVZ, no evalúan si en este modelo animal la diferenciación neuronal se ve alterada (Li et al., 2010).

En resumen podemos concluir que, el IFN γ mediante la regulación de la proliferación y diferenciación celular actúa como un regulador negativo de la neurogénesis del eje SVZ-OB en condiciones fisiológicas.

3. Efecto de la IL-10 en la neurogénesis del eje SVZ-OB

El receptor de IL-10 está compuesto por la subunidad IL-10R2, la cual se expresa constitutivamente en todo el SNC y media la señalización celular, y por la subunidad IL-10R1 que es necesaria para la unión del ligando (Pestka et al., 2004; González et al., 2009; Ouyang et al., 2011) y no está apenas expresada en el SNC (Allen Brain Atlas, Pérez-Asensio et al., 2013). Estudios previos del laboratorio detectaron la expresión de IL-10R1 en la SVZ adulta y postnatal, así como en los cultivos primarios de SVZ postnatal. Lo cual sugiere un posible efecto directo de la IL-10 sobre los progenitores neurales de dicha zona (Pérez-Asensio et al., 2013). Posteriormente, la caracterización celular de IL-10R1 en la SVZ mediante análisis histológico, demostró como a lo largo de toda la SVZ, el receptor de IL-10R1 se encuentra colocalizado con el marcador de células endodiales S100 β . Además, únicamente en la región dorsal de la SVZ se detectó la presencia de IL-10R1 en los progenitores Nestina+. Esto sugiere que la citocina podría actuar de manera específica sobre la población de progenitores Nestina+ ubicados en la región dorsal (Pérez-Asensio et al., 2013).

Como hemos comentado a lo largo de la presente tesis doctoral, los fenómenos de proliferación, auto-renovación y diferenciación celular que se dan en la SVZ están estrictamente regulados por factores intrínsecos y extrínsecos. De este modo, se ha observado como la proteína endógena PEDF, producida y liberada por las células endoteliales de la microvasculatura de la SVZ, es capaz de promover la auto-renovación celular y mantener el estado indiferenciado de los progenitores de la SVZ (Andreu-Agulló et al., 2009). Del mismo modo se ha observado como los niveles de la proteína reguladora del ciclo celular, p21, modulan los niveles de Sox2, traducándose en una capacidad de regular la proliferación celular y el potencial de diferenciación de las NSCs (Marqués-Torrejón et al., 2013). Además, recientemente se ha descrito un mecanismo de interacción celular en el que la proteína N-Cadherina media la unión entre las NSCs de la SVZ, en estado quiescente, y las células endodiales que tapizan el LV. De este modo, se ha comprobado como la proteína MT5-MMP provoca la proteólisis de la N-Cadherina y ello conlleva a la activación de las NSCs en la SVZ, sugiriendo que la interacción Célula-Célula en la SVZ, mediada por la N-Cadherina y MT5-MMP, regulan la quiescencia/actividad de las NSCs (Porlán et al., 2014).

Discusión

En nuestros estudios, tras el tratamiento ICV de IL-10 durante 7 días, el análisis de la incorporación de BrdU muestra como la citocina no altera el número de células BrdU+ ni en la región ventral, ni en la región dorsal de la SVZ. Del mismo modo, el número de células PCNA+ no se ve alterada con el tratamiento de la citocina. En conjunto, los resultados indican que la proliferación celular de la SVZ no se ve alterada tras la exposición a la IL-10. No obstante si se detectó un incremento del marcador de ciclo celular Ki67 en la región dorsal de la SVZ, tras el tratamiento ICV con la citocina. Estas observaciones están en consonancia con los efectos observados sobre cultivos primarios de SVZ dorsal; en éstos se pudo observar como la IL-10 no altera ni la autorenovación ni la proliferación celular pero sí incrementa el número de células en ciclo (Ki67+) sugiriendo un efecto de la IL-10 sobre el ciclo celular de los progenitores neurales (Pérez-Asensio et al., 2013). Estudios en más detalle mediante marcadores de distintas fases del ciclo celular, mostraron como la IL-10 participa en la regulación del ciclo celular de los progenitores neurales, promoviendo la acumulación de éstos en la fase de transición G2-M, frenando así su salida del ciclo celular (Pérez-Asensio et al., 2013).

Los estudios mostrados en la presente tesis doctoral muestran como en el modelo animal de ganancia de función de IL-10 durante 7 días, se produce un incremento en el número de células Nestina+ en la SVZ, mientras que la población de células DCX+ y PSA-NCAM+ en la región de la SVZ se ve reducida. Todo esto indicaría que la IL-10 favorece el estado indiferenciado de los progenitores en la SVZ, y esto finalmente conllevaría a la reducción de la integración de las nuevas neuronas en el OB (Pérez-Asensio et al., 2013). Estos efectos fueron apoyados gracias a los estudios realizados sobre animales deficientes para la IL-10, en los cuales la neurogénesis endógena está incrementada sin aparente alteración de la proliferación celular.

Todas estas observaciones ponen de manifiesto que la IL-10 afecta a la población de progenitores Nestina+ localizados en la región dorsal de la SVZ, donde promueve el estado indiferenciado de los progenitores e impide su diferenciación neuronal. Por lo tanto, la citocina interviene en la regulación del proceso neurogénico del eje SVZ-OB en condiciones fisiológicas.

Discusión

Estudios de trazabilidad celular han demostrado que la localización o regionalización de las NSCs a lo largo del eje dorsoventral de la SVZ determina el fenotipo celular final que adquieren las nuevas neuronas generadas al alcanzar su diana final, el OB (Merkle et al., 2007; Merkle et al., 2013). Los progenitores neurales de la zona dorsal de la SVZ generan interneuronas granulares superficiales e interneuronas periglomerulares TH+, mientras que los progenitores de la región ventral de la SVZ generan interneuronas granulares profundas e interneuronas periglomerulares Cb+ (Merkle et al., 2007; Lledó et al., 2008). Este fenómeno se debe a que los progenitores neurales de la SVZ presentan un código de expresión de factores de transcripción autónomo, dependiendo de su origen en la SVZ. Recientemente, se ha caracterizado como la expresión de los factores de transcripción Gli1, Nkx6.2 y Zic está regionalizada a lo largo de la SVZ. El morfógeno Shh se produce a niveles elevados en la región ventral de la SVZ y regula la expresión de Gli1, y su presencia en la zona ventral es necesaria para la producción de determinados tipos de interneuronas granulares. No obstante, la activación ectópica en la zona dorsal de la SVZ es capaz de re-especificar el fenotipo neuronal de su progenie (Merkle et al., 2013). En este sentido, la expresión del IL-10R1 localizada en los progenitores Nestina+ de la región dorsal sugiere también la presencia de un patrón molecular en la SVZ, que distingue de manera general la SVZ en la región ventral y dorsal. Los progenitores generados a lo largo de la SVZ se mueven por las paredes del LV hasta alcanzar la región dorsal de la SVZ donde se disponen a migrar a través del RMS (Kakita y Goldman, 1999; Sawamoto et al., 2006; Nam et al., 2007). Ante esto, la IL-10 tendría la capacidad de controlar la neurogénesis actuando específicamente sobre los progenitores Nestina+ cuando se encuentran en la región dorsal de la SVZ e independientemente de su origen. En un futuro sería interesante investigar si la IL-10 afecta de manera diferencial a la especificación de los diferentes subtipos de interneuronas que finalmente poblaran el OB.

4. Posible acción del IFN γ e IL-10 en la neurogénesis ante lesión cerebral

El balance entre las señales proinflamatorias y antiinflamatorias es fundamental en la fisiología del cerebro. El microambiente de la SVZ permite que los progenitores neurales tengan una comunicación continua con las señales proinflamatorias y antiinflamatorias aportadas por los vasos sanguíneos, microglía y astrocitos del entorno del nicho neurogénico. A su vez, las NSCs están en contacto directo con el LCR del LV, el cual también aporta continuamente señales capaces de regular la neurogénesis endógena. Por lo tanto, en situaciones de daño cerebral, el sistema inmunitario e inflamatoria serán activados, y los perfiles de expresión de las citocinas alterados, que al interactuar con el nicho neurogénico, podrán alterar el proceso neurogénico.

La respuesta inflamatoria presenta una cronología de sucesos definida. Ante un daño o lesión cerebral, se activa la síntesis de citocinas proinflamatorias con el fin de combatir, en una primera instancia, el proceso inflamatorio. A su vez, el incremento de los niveles de citocinas proinflamatorias incrementa la permeabilidad vascular y de la BHE, permitiendo el reclutamiento de células del sistema inmunitario en el lugar de la lesión. Las citocinas del entorno son capaces de activar a las células del sistema inmunitario con el fin de regular el proceso inflamatorio. Por ello, al cabo de un tiempo se verán también incrementados los niveles de citocinas antiinflamatorias, capaces de inhibir la síntesis y acción de las citocinas proinflamatorias y poder así volver a la situación normal (Carpentier y Palmer, 2009; Dooley et al., 2013). Por lo tanto, ante situaciones de lesión cerebral se pierde el equilibrio fisiológico entre las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, pudiendo éste afectar, en mayor o en menor medida, a la neurogénesis en función de la cronicidad e intensidad de la lesión.

Diversos estudios se han centrado en el papel que ejercen las citocinas en la neurogénesis antes situaciones patológicas. De este modo, se detectó un incremento en los niveles de la citocina proinflamatoria IL-1 β en el cerebro en un modelo animal de estrés. El análisis de la SVZ de dichos animales mostró un descenso en la incorporación de BrdU, mostrando por lo tanto, un descenso en la proliferación celular de la SVZ (Koo y Duman, 2008). Con el fin de determinar la implicación de la citocina IL-1 β en la patología de estrés, se realizaron experimentos *in vivo* caracterizados por la

Discusión

administración de un antagonista del receptor de IL-1 β . El análisis de la SVZ mostró una recuperación en la proliferación celular del hipocampo de los animales sometidos a estrés, sugiriendo que esta citocina también interviene en la regulación de la neurogénesis en condiciones patológicas (Koo y Duman, 2008).

En modelos animales de epilepsia detectaron un incremento de los niveles plasmáticos de TNF α , así como un incremento del número de células BrdU+/NeuN+ en el GD del hipocampo. Con el fin de determinar el efecto de TNF α en la neurogénesis ante estados epilépticos, se realizaron estudios en animales deficientes en los receptores de TNF α (TNF-R1, TNF-R2), así como a animales deficientes en ambos receptores (TNF-R1/TNF-R2). Tras el análisis histológico de los animales sometidos a epilepsia, se observó un incremento del número de células BrdU+/NeuN+ en el GD de los animales deficientes en TNF-R1, mientras que los animales deficientes en TNF-R2 mostraban una reducción del número de células BrdU+/NeuN+ respecto a los animales salvajes. Por otro lado, el análisis histológico de los animales deficientes en ambos receptores (TNF-R1/TNF-R2) mostró un incremento del número de células BrdU+/NeuN+ en comparación con los animales salvajes. Por lo tanto, con los resultados mostrados los autores sugieren que la señalización a través de TNF-R1 participa en la reducción de la proliferación hipocampal en condiciones patológicas, mientras que la señalización a través de TNF-R2 participa en la supervivencia celular. Sugiriendo que la inhibición del TNF-R1 y la estimulación del TNF-R2 podría ser una estrategia terapéutica para mejorar la neurogénesis endógena y las funciones cognitivas en situaciones patológicas (Iosif et al., 2006).

Por otro lado, nuestros resultados indican que ambas citocinas, IFN γ e IL-10, intervienen en la regulación de la neurogénesis en condiciones fisiológicas, sin embargo, ¿Cuál podría ser el efecto de dichas citocinas en la neurogénesis endógena en situaciones patológicas? Se ha observado que en el modelo animal de Alzheimer de doble transgénico la presencia de IFN γ incrementa la proliferación y la presencia de nuevos neuroblastos en el GD del hipocampo (Baron et al., 2006). Asimismo, estudios comportamentales demostraron como los animales doble transgénicos mejoraban los procesos cognitivos, sugiriendo que la citocina incrementa la neurogénesis del GD del hipocampo en la patología de Alzheimer (Baron et al., 2008).

Discusión

Por otro lado, en un modelo animal de Alzheimer, la administración intracerebral de IL-10, mediante un vector adenoviral, muestra un incremento en la neurogénesis del GD del hipocampo respecto al control (Kiyota et al., 2012). Por otro lado, estudios en un modelo animal de EAE (Encefalomiелitis Autoinmune Experimental) muestran que la administración intracerebral de NSCs capaces de liberar constantemente IL-10 (mediante la modificación con vectores lentivirales) potencian la neurogénesis y oligodendrogénesis en detrimento de la astrogliogénesis (Yang et al., 2009); los autores sugieren que la acción antiinflamatoria de la IL-10 podría mejorar el entorno celular para la correcta remielinización y supervivencia neuronal y oligodendroglial (Yang et al., 2009).

Estudios *in vivo*, hace ya más de una década, observaron como en modelos animales de isquemia cerebral la SVZ incrementaba la proliferación celular y el número de nuevos neuroblastos en la SVZ del hemisferio ipsilateral (Zhang et al., 2001; Arvidsson et al., 2002; Lindvall et al., 2004). Además, se observó como las nuevas neuronas adquirían el fenotipo neural dañado y migran al lugar de la lesión. Sin embargo, a pesar de que la SVZ incrementa la neurogénesis en situaciones isquémicas, existe un porcentaje muy bajo de neuronas que se integrarán funcionalmente en el tejido dañado (Lindvall et al., 2004). En cuanto a las señales moleculares y celulares que participan en este proceso, se ha observado como tras un episodio isquémico se incrementa la expresión de citocinas IL-1 β , IFN γ , IL-17, IL-8, IL-10, IL-4 en el cerebro (Li et al., 2001), y los niveles de los factores IGF-1, VEGF, FGF2 o EGF, los cuales promueven la formación de vasos sanguíneos y la proliferación celular en la SVZ (Craig et al., 1996; Kuhn et al., 1997; Thored et al., 2009; Kokaia y Lindvall, 2012). También, han sido descritas señales quimioattractoras que permiten la migración de los neuroblastos al lugar de la lesión, es el caso de la interacción SDF1/CXCR4 y MCP1/CCR2 (Thored et al., 2006; Yan et al., 2006). Por lo tanto, los mecanismos moleculares y celulares activados después de una lesión cerebral isquémica son muy variados y complejos, esto dificultará descifrar el papel específico que pueda ejercer una vía concreta activada, ya que el resultado final será la causa de la suma o integración de todos los mecanismos activos participantes.

Varios estudios indican que el bloqueo de la inflamación es beneficioso para la neurogénesis post-traumática; el empleo de moléculas antiinflamatorias después de

Discusión

un episodio isquémico es beneficioso, ya que incrementa la nueva producción de todos los fenotipos neurales (Hoehn et al., 2005).

En este sentido, se ha observado como la IL-10 reducen el volumen de infarto y el daño post-isquémico (Spera et al., 1998) y como los animales deficientes en IL-10 presentan un incremento del volumen de infarto (Grilli et al., 2000; Pérez-de Puig et al., 2014); por otro lado, los pacientes que han sufrido episodios de isquemia cerebral y presentan bajos niveles plasmáticos de IL-10 tienen un mayor riesgo a evolucionar negativamente en la patología (Vila et al., 2003). Estos datos apuntan al posible efecto beneficioso de la IL-10 en patologías como la isquemia cerebral, por ello, sería interesante estudiar en un futuro el efecto que podría ejercer la IL-10 sobre la neurogénesis endógena en modelos animales de isquemia cerebral.

CONCLUSIONES

Conclusiones:

- 1. El IFN γ induce una reducción en la proliferación celular en la SVZ adulta.**
- 2. El IFN γ promueve la diferenciación neuronal en la SVZ; en oposición la diferenciación oligodendroglial no se ve afectada por dicha citocina.**
- 3. El IFN γ reduce la incorporación de nuevas neuronas en el OB.**
- 4. La IL-10 no altera la proliferación celular en la SVZ dorsal.**
- 5. La administración ICV de IL-10 incrementa la población Nestina+ en la región dorsal de la SVZ, mientras que la diferenciación neuronal se ve reducida en esta zona.**
- 6. La administración ICV de IL-10 reduce la incorporación de nuevas neuronas en el OB.**
- 7. Los animales deficientes en IL-10 muestran un incremento en la diferenciación neuronal y una reducción de los progenitores Nestina+ de la región dorsal de la SVZ.**
- 8. Los animales deficientes en IL-10 muestran un incremento en la incorporación de nuevas neuronas en el OB.**

Bibliografía

A

- Abramova N, Charniga C, Goderie SK, Temple S. Stage-specific changes in gene expression in acutely isolated mouse CNS progenitor cells. *Dev Biol* 2005 Jul 15; 283(2): 269-81.
- Aguirre A, Gallo V. Reduced EGFR signaling in progenitor cells of the adult subventricular zone attenuates oligodendrogenesis after demyelination. *Neuron Glia Biol* 2007; 3: 209–220.
- Alboni S, Cervia D, Sugama S, Conti B. Interleukin 18 in the CNS. *J Neuroinflamm* 2010; 7: 9–20.
- Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 1969; 137: 433–458.
- Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965 Jun; 124(3): 319-35.
- Álvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 2002 Feb 1;22(3):629-34. Review.
- Álvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebohm F. Proliferation “hot spots” in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron* 1990; 5: 101–109.
- Álvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull* 2002 Apr; 57(6): 751-8. Review.
- An L, Zhang YZ, Yu NJ et al. The total flavonoids extracted from Xiaobuxin-Tang up-regulate the decreased hippocampal neurogenesis and neurotrophic molecules expression in chronically stressed rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008; 32: 1484–1490.
- Andreu-Agulló C, Morante-Redolat JM, Delgado AC, Fariñas I. Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone. *Nat Neurosci* 2009; 12: 1514-23.
- Ara J, See J, Mamontov P, Hahn A, Bannerman P, Pleasure D, Grinspan JB. Bone morphogenetic proteins 4, 6, and 7 are up-regulated in mouse spinal cord during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 2008; 86: 125–135.
- Araujo DM, Cotman CW. Trophic effects of interleukin-4-7 and -8 on hippocampal neuronal cultures: potential involvement of glial-derived factors. *Brain Research* 1993; 600: 49–55.
- Araujo DM, Cotman CW. Differential effects of interleukin-1 beta and interleukin-2 on glia and hippocampal neurons in culture. *International Journal of Developmental Neuroscience* 1995; 13: 201–212.

Bibliografía

- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002; 8(9): 963–970.

B

- Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:563-91. Review.
- Bachiller D, Klingensmith J, Kemp C, Belo JA, Anderson RM, May SR, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM, Rossant J, DeRobertis EM. The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature* 2000; 403: 658–661.
- Balazs R, Vernon J, Hardy J. Epigenetic mechanisms in Alzheimer’s disease: progress but much to do. *Neurobiol Aging* 2011; 32: 1181–1187.
- Balordi F, Fishell G. Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J Neurosci* 2007; 27:5936-47.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1982; 1(5): 549-53.
- Barker PA. p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron* 2004 May 27;42(4):529-33. Review.
- Barnea A, Nottebohm F. Recruitment and replacement of hippocampal neurons in young and adult chickadees: an addition to the theory of hippocampal learning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 Jan 23; 93(2): 714-8.
- Baron R, Nemirovsky A, Harpaz I, Cohen H, Owens T, Monsonogo A. IFN- γ enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer’s disease. *FASEB J* 2008Apr; 7
- Bath KG, Mandairon N, Jing D, Rajagopal R, Kapoor R, Chen ZY, Khan T, Proenca CC, Kraemer R, Cleland TA, Hempstead BL, Chao MV, Lee FS. Variant brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) alters adult olfactory bulb neurogenesis and spontaneous olfactory discrimination. *J Neurosci* 2008; 28: 2383–2393.
- Battista D, Rutishauser U. Removal of polysialic acid triggers dispersion of subventricularly derived neuroblasts into surrounding CNS tissues. *J Neurosci* 2010; 30: 3995-4003.
- Bauer S. Leukemia inhibitory factor is a key signal for injury-induced neurogenesis in the adult mouse olfactory epithelium. *J Neurosci* 2003; 23: 1792–1803.
- Bauer S, Patterson PH. Leukemia inhibitory factor promotes neural stem cell selfrenewal in the adult brain. *J Neurosci* 2006; 26: 12089–12099.

Bibliografía

- Bauer S. Cytokine Control of Adult Neural Stem Cells Chronic versus Acute Exposure. *Neuroimmunomodulation: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2009; 1153: 48–56.
- Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, LoTurco JJ. Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 2003 Nov 12; 23(32): 10411-8.
- Ben-Hur T, Ben-Menachem O, Furer V, Einstein O, Mizrachi-Kol R, Grigoriadis N. Effects of proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci* 2003; 24: 623–631.
- Bogdan C, Schleicher U. Production of interferon by myeloid cells factor fancy? *Trends Immunol* 2006; 27: 282–290.
- Bond AM, Bhalala OG, Kessler JA. The dynamic role of bone morphogenetic proteins in neural stem cell fate and maturation. *Dev Neurobiol* 2012 Jul; 72(7):1068-84.
- Bonaguidi MA, Wheeler MA, Shapiro JS, Stadel RP, Sun GJ, Ming GL, Song H. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*. 2011 Jun 24; 145(7):1142-55.
- Bonnet E, Touyarot K, Alfons S et al. Retinoic acid restores adult hippocampal neurogenesis and reverses spatial memory deficit in vitamin A deprived rats. *PLoS One* 2008; 3: e3487.
- Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I, et al. Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 1997; 278: 477-83.
- Boutin H, LeFeuvre RA, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell NJ. Role of IL-1 α and IL-1 β in ischemic brain damage. *J Neurosci* 2001; 21: 5528–5534.
- Bovetti S. Olfactory enrichment influences adult neurogenesis modulating GAD67 and plasticity-related molecules expression in newborn cells of the olfactory bulb. *PLoS One* 2009; 4: e6359.
- Bray S, Bernard F. Notch targets and their regulation. *Curr Top Dev Biol* 2010; 253–275.
- Breunig JJ, Silbereis J, Vaccarino FM, Sestan N, Rakic P. Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 20558–20563.
- Brill MS, Ninkovic J, Winpenny E, Hodge RD, Ozen I, Yang R, Lepier A, Gascón S, Erdelyi F, Szabo G, Parras C, Guillemot F, Frotscher M, Berninger B, Hevner RF, Raineteau O, Götz M. Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nat Neurosci* 2009 Dec; 12(12):1524-33.
- Budagian V, Bulanova E, Paus R, Bulfone-Paus S. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006, 17: 259–280.

Bibliografía

- Buss RR, Sun W, Oppenheim RW. Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 2006;29:1-35. Review.
- Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, Schwartz M. Activation of microglia by aggregated β -amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN- γ and IL-4 render them protective. *Mol Cell Neurosci* 2007; 29: 381–393.
- Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S. Microglia activated by IL-4 or IFN- γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 2006; 31: 149–160.

C

- Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 2001 Jul 9; 435(4): 406-17.
- Campbell K, Gotz M. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* 2002; 25: 235–238.
- Cao F, Hata R, Zhu P, Nakashiro K, Sakanaka M. Conditional deletion of Stat3 promotes neurogenesis and inhibits astrogliogenesis in neural stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394:843-7.
- Capela A, Temple S. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 2002; 35: 865–875.
- Capilla-González V, Cebrian-Silla A, Guerrero-Cazares H, Garcia-Verdugo JM, Quiñones-Hinojosa A. The generation of oligodendroglial cells is preserved in the rostral migratory stream during aging. *Front Cell Neurosci* 2013; 7:147.
- Carlen M, Meletis K, Goritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, Amendola M, Barnabe-Heider F, Yeung MS, Naldini L. Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat. Neurosci* 2009; 12: 259–267.
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Álvarez-Buylla A, Lledó PM. 2003. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6:507-518.
- Carpentier PA, Palmer TD. Immune influence on adult neural stem cell regulation and function. *Neuron* 2009 Oct 15; 64(1): 79-92. Review.
- Casadesus G, Shukitt-Hale B, Stellwagen HM et al. Modulation of hippocampal plasticity and cognitive behavior by short-term blueberry supplementation in aged rats. *Nutr Neurosci* 2004; 7: 309–316.
- Cate HS, Sabo JK, Merlo D, Kemper D, Aumann TD, Robinson J, Merson TD, Emery B, Perreau VM, Kilpatrick TJ. Modulation of bone morphogenic protein signalling alters

Bibliografía

- numbers of astrocytes and oligodendroglia in the subventricular zone during cuprizone-induced demyelination. *J Neurochem.* 2010 ; 115(1): 11-22.
- Chang CF, Lin SZ, Chiang YH, Morales M, Chou J, Lein P, Chen HL, Hoffer BJ, Wang Y. Intravenous administration of bone morphogenetic protein-7 after ischemia improves motor function in stroke rats. *Stroke* 2003; 34: 558–564.
 - Chao CC, Molitor TW, Hu S. Neuroprotective role of IL-4 against activated microglia. *Journal of Immunology* 1993; 151: 1473–1481.
 - Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 299 –309.
 - Cheng X, Wang Y, He Q, Qiu M, Whittemore SR, Cao Q. Bone morphogenetic protein signaling and Olig1/2 interact to regulate the differentiation and maturation of adult oligodendrocyte precursor cells. *Stem Cells* 2007; 25: 3204–3214.
 - Chenn A, Walsh CA. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* 2002 Jul 19;297(5580):365-9.
 - Chiaramello S, Dalmaso G, Bezin L, Marcel D, Jourdan F, Peretto P, Fasolo A, De Marchis S. BDNF/ TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 1780 –1790.
 - Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, van der Kooy D. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci* 1999 Jun 1;19(11):4462-71.
 - Conover JC, Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Gale NW, Yancopoulos GD, Álvarez-Buylla A. Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci* 2000; 3: 1091-1097.
 - Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY, Reiter JF. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 2005; 437, 1018–1021.
 - Coskun V, Luskin MB. Intrinsic and extrinsic regulation of the proliferation and differentiation of cells in the rodent rostral migratory stream. *J Neurosci Res* 2002; 69: 795-802.
 - Covey MV, Levison SW. Leukemia inhibitory factor participates in the expansion of neural stem/progenitors after perinatal hypoxia/ischemia. *Neuroscience* 2007; 148: 501–509.
 - Cowan WM, Fawcett JW, O’liary DM. Regressive events in neurogenesis. *Science* 1984; 225:1258-65.
 - Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* 1996; 16: 2649–2658.

D

- Dahlqvist P, Ronnback A, Bergstrom SA, Soderstrom I, Olsson T. Environmental enrichment reverses learning impairment in the Morris water maze after focal cerebral ischemia in rats. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 2288–2298.
- Dallner C, Woods AG, Deller T, Kirsch M, Hofmann HD. CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain. *Glia* 2002; 37: 374–378.
- De Ferrari GV, Moon RT. The ups and downs of Wnt signaling in prevalent neurological disorders. *Oncogene* 2006; 25: 7545–7553.
- De Robertis EM, Kuroda H. Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 285-308.
- De Simone R, Levi G, Aloisi F. Interferon γ gene expression in rat central nervous system glial cells. *Cytokine* 1998; 10: 418–422.
- De Lella Ezcurra AL, Chertoff M, Ferrari C, Graciarena M, Pitossi F. Chronic expression of low levels of tumor necrosis factor-alpha in the substantia nigra elicits progressive neurodegeneration, delayed motor symptoms and microglia/macrophage activation. *Neurobiol Dis* 2010 Mar; 37(3): 630-40.
- De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, De Vries JE. Interleukin10 (IL- 10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174: 1209–1220.
- De Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennett B, Culpepper J. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *J Immunol* 1993; 151: 6370–6381.
- Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci.* 2010 May;11(5):339-50. Review.
- Doepfner TR, Bretschneider E, Doehring M, Segura I, Sentürk A, Acker-Palmer A, Hasan MR, ElAli A, Hermann DM, Bähr M. Enhancement of endogenous neurogenesis in ephrin-B3 deficient mice after transient focal cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 2011; 122: 429-42.
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 1997; 17: 5046–5061.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999a; 97: 703–716.

Bibliografía

- Doetsch F, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999b; 96: 11619–11624.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 2002; 36: 1021–1034.
- Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci.* 2003 Nov;6(11):1127-34. Epub 2003b Oct 28. Review
- Dooley D, Vidal P, Hendrix S. Immunopharmacological intervention for successful neural stem cell therapy: New perspectives in CNS neurogenesis and repair. *Pharmacol Ther* 2014 Jan;141(1):21-31.
- Duan W, Guo Z, Jiang H, Ware M, Mattson MP. Reversal of behavioral and metabolic abnormalities, and insulin resistance syndrome, by dietary restriction in mice deficient in brain-derived neurotrophic factor. *Endocrinology* 2003; 144: 2446–53.
- Duman R. Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry* 2004; 56: 140–145.
- Dyall SC, Michael GJ, Michael-Titus AT. Omega-3 fatty acids reverse age-related decreases in nuclear receptors and increase neurogenesis in old rats. *J Neurosci Res* 2010; 88: 2091–2102.

E

- Eckenhoff MF, Rakic P. Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkey. *J Neurosci* 1988 Aug; 8(8): 2729-47.
- Ehm O, Goritz C, Covic M, Schaffner I, Schwarz TJ, Karaca E, Kempkes B, Kremmer E, Pfrieger FW, Espinosa L, Bigas A, Giachino C, Taylor V, Frisen J, Lie DC. RBPJkappa-dependent signaling is essential for long-term maintenance of neural stem cells in the adult hippocampus, *J. Neurosci* 2010; 30: 13794–13807.
- Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 13632–13637.
- Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. Brain inflammation and adult neurogenesis: The dual role of microglia. *Neuroscience* 2009; 158: 1021–1029.
- Emsley JG, Hagg T. Alpha6beta1 integrin directs migration of neuronal precursors in adult mouse forebrain. *Exp Neurol* 2003; 183: 273-285.
- Emsley JG, Hagg T. Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice. *Exp Neurol* 2003; 183: 298–310.

Bibliografía

- Eom TY, Li J, Anton ES. Going tubular in the rostral migratory stream: neurons remodel astrocyte tubes to promote directional migration in the adult brain. *Neuron* 2010; 67: 173-175.
- Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisén J. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 2014 Feb 27;156 (5): 1072-83.

F

- Feng AS, Hall JC, Siddique S. Coding of temporal parameters of complex sounds by frog auditory nerve fibers. *J Neurophysiol* 1991 Mar; 65(3): 424-45.
- Fike JR, Rola R, Limoli CL. Radiation response of neural precursor cells. *Neurosurg Clin N Am* 2007; 18(1): 115–127.
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 2003 Jul; 23(3): 373-82.
- Fiore M, Triaca V, Amendola T, Tirassa P, Aloe L. Brain NGF and EGF administration improves passive avoidance response and stimulates brain precursor cells in aged male mice. *Physiol Behav* 2002; 77: 437–443.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991; 147: 3815–3822.
- Foti SB, Chou A, Moll AD, Roskams AJ. HDAC inhibitors dysregulate neural stem cell activity in the postnatal mouse brain. *Int J Dev Neurosci* 2013; 31: 434-47.
- Francis N, Farinas I, Brennan C, Rivas-Plata K, Backus C, Reichardt L, Landis S. NT-3, like NGF, is required for survival of sympathetic neurons, but not their precursors. *Dev Biol* 1999 Jun 15; 210(2): 411-27.
- Friedman WJ, Ibáñez CF, Hallböök F, Persson H, Cain LD, Dreyfus CF, Black IB. Differential actions of neurotrophins in the locus coeruleus and basal forebrain. *Exp Neurol* 1993 Jan; 119(1): 72-8.

G

- Gadea A, Aguirre A, Haydar TF, Gallo V. Endothelin-1 regulates oligodendrocyte development. *J Neurosci* 2009 Aug 12;29(32):10047-62.
- Galvão RP, Garcia-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Brain-derived neurotrophic factor signaling does not stimulate subventricular zone neurogenesis in adult mice and rats. *J Neurosci* 2008 Dec 10; 28(50):13368-83.

Bibliografía

- García-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Álvarez-Buylla A. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol* 1998 Aug; 36(2): 234-48.
- García-Verdugo JM, Ferron S, Flames N, Collado L, Desfilis E, Font E. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull* 2002; 57: 765–775.
- Giachino C, Basak O, Lugert S, Knuckles P, Obernier K, Fiorelli R, Frank S, Raineteau O, Álvarez-Buylla A, Taylor V. Molecular diversity subdivides the adult forebrain neural stem cell population. *Stem Cells* 2014; 32(1): 70-84.
- Gobbo OL, O'Mara SM. Impact of enriched environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia. *Behav Brain Res* 2004; 152: 231–241.
- Goldsby R, Kindt R, Osborne B. *Kuby Immunology* 2000. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation.
- Gómez-Pinilla F, Dao L, Vannarith S. Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. *Brain Res* 1997; 764: 1–8.
- Gómez-Nicola D, Valle-Argos B, Pita-Thomas DW, Nieto-Sampedro M. Interleukin 15 expression in the CNS: blockade of its activity prevents glial activation after an inflammatory injury. *Glia* 2008a; 56: 494–505.
- Gómez-Nicola D, Valle-Argos B, Suardiá M, Taylor JS, Nieto-Sampedro M. Role of IL-15 in spinal cord and sciatic nerve after chronic constriction injury: regulation of macrophage and T-cell infiltration. *J Neurochem* 2008b; 107: 1741–1752.
- Gómez-Nicola D, Valle-Argos B, Pallas-Bazarra N, Nieto-Sampedro M. Interleukin-15 regulates proliferation and self-renewal of adult neural stem cells. *Mol Biol Cell* 2011; 22: 1960–1970.
- González AM, Berry M, Maher PA, Logan A, Baird A. A comprehensive analysis of the distribution of FGF-2 and FGFR1 in the rat brain. *Brain Res* 1995; 701: 201–226.
- González P, Burgaya F, Acarin L, Peluffo H, Castellano B, Gonzalez B. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor-I are upregulated in glial cells after an excitotoxic injury to the postnatal rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009 Apr;68(4):391-403
- González-Pérez O, Romero-Rodríguez R, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone Type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. *Stem Cells* 2009; 27: 2032–2043.
- González-Pérez O, Gutiérrez-Fernández F, López-Virgen V, Collas-Aguilar J, Quinones-Hinojosa A, García-Verdugo JM. Immunological regulation of neurogenic niches in the adult brain. *Neuroscience* 2012; 226: 270–281.

Bibliografía

- González-Perez O, Álvarez-Buylla A. Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. *Brain Res Rev* 2011; 67(1-2): 147-56.
- Gotts JE, Chesselet MF. Migration and fate of newly born cells after focal cortical ischemia in adult rats. *J Neurosci Res* 2005; 80: 160-171.
- Gotz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 777–788.
- Grade S, Weng YC, Snapyan M, Kriz J, Malva JO, Saghatelyan A. Brain-derived neurotrophic factor promotes vasculature-associated migration of neuronal precursors toward the ischemic striatum. *PLoS One*. 2013; 8(1):e55039.
- Grilli M, Barbieri I, Basudev H, Brusa R, Casati C, Lozza G, Ongini E. Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage. *Eur J Neurosci* 2000 Jul;12(7):2265-72.
- Grimaldi P, Carletti B, Magrassi L, Rossi F. Fate restriction and developmental potential of cerebellar progenitors. *Transplantation studies in the developing CNS. Prog Brain Res* 2005; 148: 57-68.
- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 2002; 22: 437-445.
- Gross RE, Mehler MF, Mabie PC, Zang ZY, Santschi L, Kessler Bone JA. Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* 1996; 17: 595–606.
- Gruber MF, Williams CC, Gerrard TL. Macrophage colony stimulating factor expression by anti-CD45 stimulated human monocytes transcriptionally up-regulated by IL-1beta and inhibited by IL-4 and IL-10. *J Immunol* 1994; 152: 1354–1361.

H

- Habibi E, Masoudi-Nejad A, Abdolmaleky HM, Haggarty SJ. Emerging roles of epigenetic mechanisms in Parkinson's disease. *Funct Integr Genomics* 2011; 11: 523–537.
- Hack MA, Saghatelyan A, de Chevigny A, Pfeifer A, Ashery-Padan R, Lledó PM, Gotz M. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci* 2005; 8: 865–872.
- Hartfuss E, Galli R, Heins N, Gotz M. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol* 2001; 229: 15–30.
- Hastings NB, Gould E. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol* 1999 Oct 11; 413(1): 146-54.

Bibliografía

- Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3196–3201.
 - He J, Nixon K, Shetty AK et al. Chronic alcohol exposure reduces hippocampal neurogenesis and dendritic growth of newborn neurons. *Eur J Neurosci* 2005; 21: 2711–2720.
 - Herschkowitz N. Brain development in the fetus, neonate and infant. *Biol Neonate* 1988;54(1):1-19. Review.
 - Hitoshi, Alexson T, Tropepe V, Donoviel D, Elia AJ, Nye JS, Conlon RA, Mak TW, Bernstein A, van der Kooy D. Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev* 2002; 16: 846–858.
 - Hockly E. Environmental enrichment slows disease progression in R6/2 Huntington's disease mice. *Ann Neurol* 2002; 51: 235–242.
 - Hoehn BD, Palmer TD, Steinberg GK. Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. *Stroke* 2005b; 36: 2718–2724.
 - Hor CH, Tang BL. Sonic hedgehog as a chemoattractant for adult NPCs. *Cell Adh Migr* 2010; Jan-Mar;4(1):1-3.
 - Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 16659–16664.
 - Hu Y, Russek SJ. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. *J Neurochem*. 2008 Apr;105(1):1-17.
- I
- Ihrie RA, Shah JK, Harwell CC, Levine JH, Guinto CD, Lezameta M, Kriegstein AR, Álvarez-Buylla A. Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity. *Neuron* 2011 Jul 28; 71(2):250-62.
 - Ihrie RA, Alvarez-Buylla A. Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron*. 2011 May 26;70(4):674-86.
 - Imayoshi I, Sakamoto M, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R. Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult. *Brains. J Neurosci* 2010; 30: 3489–3498.
 - Imura T, Kornblum HI, Sofroniew MV. The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *J Neurosci* 2003; 23: 2824–2832.

Bibliografía

- Iosif RE, Ekdahl CT, Ahlenius H, Pronk CJ, Bonde S, Kokaia Z, Jacobsen SE, Lindvall O. Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 2006; 26: 9703–9712.
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* 1998 Jun 1;57(1):1-9.
- Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke* 2001 May;32(5):1208-15.

J

- Jablonska B, Aguirre A, Raymond M, Szabo G, Kitabatake Y, Sailor KA, Ming GL, Song H, Gallo V. Chordin-induced lineage plasticity of adult SVZ neuroblasts after demyelination. *Nat Neurosci* 2010 May; 13(5): 541-50.
- Jackson EL, Garcia-Verdugo JM, Gil-Perotin S, Roy M, Quinones-Hinojosa A, VandenBerg S, Álvarez-Buylla A. PDGFRalpha positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* 2006; 51: 187–199.
- Jakubs K, Bonde S, Iosif RE, Ekdahl CT, Kokaia Z, Kokaia M, Lindvall O. Inflammation regulates functional integration of neurons born in adult brain. *J Neurosci* 2008; 28: 12477–12488.
- Ji H, Miao J, Zhang X, Du Y, Liu H, Li S, Li L. Inhibition of sonic hedgehog signaling aggravates brain damage associated with the down-regulation of Gli1, Ptch1 and SOD1 expression in acute ischemic stroke. *Neurosci Lett* 2012 Jan 6; 506(1):1-6.
- Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell* 2008; 15:801-12.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999; 96: 25–34.
- Johnson JE, Barde YA, Schwab M, Thoenen H. Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 1986 Oct; 6(10): 3031-8.

K

- Kahn MA, Kumar S, Liebl D, Chang R, Parada LF, De Vellis J. Mice lacking NT-3, and its receptor TrkC, exhibit profound deficiencies in CNS glial cells. *Glia* 1999; 26: 153–165.

Bibliografía

- Kakita A, Goldman JE. Patterns and dynamics of SVZ cell migration in the postnatal forebrain: monitoring living progenitors in slice preparations. *Neuron* 1999 Jul;23(3):461-72.
- Kamm K, Vanderkolk W, Lawrence C, Jonker M, Davis AT. The effect of traumatic brain injury upon the concentration and expression of interleukin-1beta and interleukin-10 in the rat. *J Trauma* 2006 Jan; 60(1): 152-7.
- Kaneko N, Kako E, Sawamoto K. Enhancement of ventricular-subventricular zone-derived neurogenesis and oligodendrogenesis by erythropoietin and its derivatives. *Front Cell Neurosci* 2013 Nov 27;7:235.
- Kaneko N, Marín O, Koike M. New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron* 2010; 67: 213-223.
- Kaplan MS, Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 1977 Sep 9;197(4308):1092-4.
- Keohane A, Ryan S, Maloney E, Sullivan AM, Nolan YM. Tumour necrosis factor-alpha impairs neuronal differentiation but not proliferation of hippocampal neural precursor cells: Role of Hes1. *Mol Cell Neurosci* 2010 Jan;43(1):127-35.
- Kerever A, Schnack J, Vellinga D, Ichikawa N, Moon C, Arikawa-Hirasawa E, Efird JT, Mercier F. Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the neurogenic factor fibroblast growth factor 2 from the extracellular milieu. *Stem Cells* 2007; 25: 2146–2157.
- Kernie SG, Parent JM. Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 2010; 37(2): 267–274.
- Kim SJ, Son TG, Kim K, Park HR, Mattson MP, Lee J. Interferon-gamma promotes differentiation of neural progenitor cells via the JNK pathway. *Neurochem Res* 2007 Aug; 32(8):1399-406.
- Kirschenbaum B, Doetsch F, Lois C, Álvarez-Buylla A. Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. *J Neurosci* 1999; 19: 2171-2180.
- Kiyota T, Ingraham KL, Swan RJ, Jacobsen MT, Andrews SJ, Ikezu T. AAV serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP+PS1 mice. *Gene Ther* 2012; 19: 724-33.
- Klassen HJ, Imfeld KL, Kirov II, Tai L, Gage FH, Young MJ. Expression of cytokines by multipotent neural progenitor cells. *Cytokine* 2003; 22: 101–106.
- Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones KR, Reichardt LF, Barbacid M. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 1991 Jul 26; 66(2): 395-403.
- Knecht AK, Bronner-Fraser M. Induction of the neural crest: a multigene process. *Nat Rev Genet* 2002 Jun;3(6):453-61. Review.

Bibliografía

- Kohwi M, Petryniak MA, Long JE. A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from Emx1 and Dlx5/6-expressing progenitors. *J Neurosci* 2007; 27: 6878-6891.
 - Kohwi M, Osumi N, Rubenstein JL, Álvarez-Buylla A. Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 2005; 25: 6997-7003.
 - Kokaia Z, Lindvall O. Stem cell repair of striatal ischemia. *Prog Brain Res* 2012;201:35-53
 - Kokaia Z, Thored P, Arvidsson A, Lindvall O. Regulation of stroke-induced neurogenesis in adult brain--recent scientific progress. *Cereb Cortex* 2006; 16(1): i162–167.
 - Kohyama J, Kojima T, Takatsuka E, Yamashita T, Namiki J, Hsieh J, Gage FH, Namihira M, Okano H, Sawamoto K, Epigenetic regulation of neural cell differentiation plasticity in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 18012–18017.
 - Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, Eriksson PS. Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke* 2005; 36: 1278–1282.
 - Koo JW, Duman RS. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jan 15; 105 (2):751-6.
 - Kosaka K, Kosaka T. Chemical properties of type 1 and type 2 periglomerular cells in the mouse olfactory bulb are different from those in the rat olfactory bulb. *Brain Res* 2007; 1167: 42-55.
 - Kriegstein A, Álvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 2009; 32: 149–184.
 - Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 1997; 17: 5820–5829.
 - Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993 Oct 22;75(2):263-74.
 - Kuroda H, Wessely O, De Robertis EM. Neural induction in *Xenopus*: requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin, beta-Catenin, and Cerberus. *PLoS Biol* 2004 May;2(5):E92.
- L**
- Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* 2003; 6, 21-27.

Bibliografía

- Lamb TM, Knecht AK, Smith WC, Stachel SE, Economides AN, Stahl N, Yancopoulos GD, Harland RM. Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* 1993; 262: 713–718.
- Law AK, Pencea V, Buck CR, Luskin MB. Neurogenesis and neuronal migration in the neonatal rat forebrain anterior subventricular zone do not require GFAP-positive astrocytes. *Dev Biol* 1999; 216: 622-634.
- Lees JR, Golumbek PT, Sim J, Dorsey D, Russell JH. Regional CNS responses to IFN- γ determine lesion localization patterns during EAE pathogenesis. *J Exp Med* 2005; 205.
- Levitt P, Rakic P. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol* 1980; 193: 815–840.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992; 69: 915–926.
- Li HL, Kostulas N, Huang YM, Xiao BG, van der Meide P, Kostulas V, Giedraitis V, Link H. IL-17 and IFN-gamma mRNA expression is increased in the brain and systemically after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neuroimmunol* 2001 May 1; 116(1):5-14.
- Li L, Walker TL, Zhang Y, Mackay EW, Bartlett PF. Endogenous interferon gamma directly regulates neural precursors in the non-inflammatory brain. *J Neurosci* 2010 Jul 7; 30(27): 9038-50.
- Li W, Cogswell CA, lo Turco JJ. Neuronal differentiation of precursors in the neocortical ventricular zone is triggered by BMP. *J Neurosci* 1998; 18: 8853–8862.
- Li X, Tang X, Jablonska B, Aguirre A, Gallo V, LuskinMB. p27(KIP1) regulates neurogenesis in the rostral migratory stream and olfactory bulb of the postnatal mouse. *J Neurosci* 2009 29:2902–2914.
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage F. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 2005; 437: 1370–1375.
- Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, Doerr H, Sommer C, Rivest S. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* 2009; 15.
- Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 2000; 28: 713–726.
- Lindvall O, Kokaia Z. Recovery and rehabilitation in stroke: stem cells. *Stroke* 2004 Nov;35 (11 Suppl 1):2691-4. Epub 2004 Sep 30. Review.

Bibliografía

- Lindvall O, Kokaia Z. Stem cell therapy for human brain disorders. *Kidney Int* 2005 Nov;68(5):1937-9. Review.
- Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 2006 Jun 29;441(7097):1094-6. Review.
- Liu Lin HI, Tzeng SF. Tumor necrosis factor- α and interleukin-18 modulate neuronal cell fate in embryonic neural progenitor culture. *Brain Res* 2005; 1054: 152–158.
- Liu Z, Martin LJ. Olfactory bulb core is a rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human. *J Comp Neurol* 2003; 459: 368-391.
- Lledó PM, Merkle FT, Álvarez-Buylla A. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci* 2008; 31: 392-400.
- Locascio A, Nieto MA. Cell movements during vertebrate development: integrated tissue behaviour versus individual cell migration. *Curr Opin Genet Dev* 2001 Aug;11(4): 464-9. Review.
- Lois C, Álvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 1994; 264: 1145-1148.
- Lois C, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Chain migration of neuronal precursors. *Science* 1996; 271: 978-981.
- Lu KT, Wang YW, Yang JT, Yang YL, Chen HI. Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. *J Neurotrauma* 2005 Aug;22(8):885-95. Erratum in: *J Neurotrauma*. 2005 Mar;26(3):469.
- Lum M, Croze E, Wagner C, McLenachan S, Mitrovic B, Turnley AM. Inhibition of neurosphere proliferation by IFN γ but not IFN β is coupled to neuronal differentiation. *J Neuroimmunol* 2009 Jan 3; 206(1-2):32-8.
- Luskin MB. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 1993; 11: 173–189.

M

- Ma DK, Jang MH, Guo JU, Kitabatake Y, Chang ML, Pow-Anpongkul N, Flavell RA, Lu B, Ming GL, Song H. Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science* 2009; 323: 1074–1077.
- Ma DK, Marchetto MC, Guo JU, Ming GL, Gage FH, Song H. Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci* 2010; 13: 1338–1344.
- Ma M, Ma Y, Yi X, Guo R, Zhu W, Fan X, Xu G, et al. Intranasal delivery of transforming growth factor-beta1 in mice after stroke reduces infarct volume and increases neurogenesis in the subventricular zone. *BMC Neurosci* 2008; 9: 117.

Bibliografía

- Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, Gritli-Linde A, Dellovade T, Porter JA, Rubin LL. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 2003; 39, 937-950.
- Mäkelä J, Koivuniemi R, Korhonen L, Lindholm D. Interferon-gamma produced by microglia and the neuropeptide PACAP have opposite effects on the viability of neural progenitor cells. *PLoS One*. 2010 Jun; 14;5(6):e11091.
- Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Kirchhoff F, Gotz M. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 2003; 37: 751–764.
- Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 2000; 127: 5253–5263.
- Malatesta P, Appolloni I, Calzolari F. Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res* 2008 Jan;331(1):165-78. Epub 2007 Sep 11. Review.
- Mandairon N. Deprivation of sensory inputs to the olfactory bulb up-regulates cell death and proliferation in the subventricular zone of adult mice. *Neuroscience* 2003; 119: 507–516.
- Mandairon N. Long-term fate and distribution of newborn cells in the adult mouse olfactory bulb: influences of olfactory deprivation. *Neuroscience* 2006; 141: 443–451
- Markakis EA, Gage FH. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol* 1999 Apr 19; 406(4): 449-60.
- Marqués-Torrejón MÁ, Porlan E, Banito A, Gómez-Ibarlucea E, Lopez-Contreras AJ, Fernández-Capetillo O, Vidal A, Gil J, Torres J, Fariñas I. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 controls adult neural stem cell expansion by regulating Sox2 gene expression. *Cell Stem Cell* 2013 Jan 3;12(1):88-100.
- Marshall CA, Novitsch BG, Goldman JE. Olig2 directs astrocyte and oligodendrocyte formation in postnatal subventricular zone cells. *J Neurosci* 2005; 25: 7289–7298.
- Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK. Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci* 2001 Sep 15; 21(18): 7046-52.
- Mattson M, Maudsley S, Martin B. A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin. *Ageing Res Rev* 2004; 3: 445–464.
- Mattson MP. Energy intake, meal frequency, and health: a neurobiological perspective. *Annu Rev Nutr* 2005; 25: 237–260.
- McMahon JA, Takada S, Zimmerman LB, Fan CM, Harland RM, McMahon AP. Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* 1998; 12: 1438–1452.

Bibliografía

- Meerlo P, Mistlberger RE, Jacobs BL, Heller HC, McGinty D. New neurons in the adult brain: the role of sleep and consequences of sleep loss. *Sleep Med Rev* 2009 Jun; 13(3): 187-94.
- Mehler MF, Mabee PC, Zhang D, Kessler JA. Bone morphogenetic proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 1997; 20:309–317.
- Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Álvarez-Buylla A. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 2006 Jul 26;26(30):7907-18.
- Merkle FT, Álvarez-Buylla A. Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol* 2006 Dec;18(6):704-9.
- Merkle FT, Mirzadeh Z, Álvarez-Buylla A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 2007; 317:381–384.
- Merkle FT, Fuentealba LC, Sanders TA, Magno L, Kessar N, Álvarez-Buylla A. Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nat Neurosci* 2013; 22.
- Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 2011 May 26; 70(4): 687-702.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 265–278.
- Mirzadeh Z, Han YG, Soriano-Navarro M, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Cilia organize ependymal planar polarity. *J Neurosci* 2010 ;30(7): 2600-10.
- Mizumatsu S, Monje ML, Morhardt DR, Rola R, Palmer TD, Fike JR. Extreme sensitivity of adult neurogenesis to low doses of X-irradiation. *Cancer Res* 2003; 63(14): 4021–4027.
- Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat Med* 2002; 8(9): 955–962.
- Monje ML, Palmer T. Radiation injury and neurogenesis. *Curr Opin Neurol* 2003; 16: 129–134.
- Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 2003; 302: 1760–1765.
- Mori T, Buffo A, Gotz M. The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol* 2005; 69: 67–99.
- Moriyama M, Fukuhara T, Britschgi M, He Y, Narasimhan R, Villeda S, Molina H, Huber BT, Holers M, Wyss-Coray T. Complement receptor 2 is expressed in neural

Bibliografía

progenitor cells and regulates adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*. 2011 Mar 16;31(11):3981-9.

- Morshead CM, Garcia AD, Sofroniew MV, van Der Kooy D. The ablation of glial fibrillary acidic protein-positive cells from the adult central nervous system results in the loss of forebrain neural stem cells but not retinal stem cells. *Eur J Neurosci* 2003 Jul;18(1):76-84.
- Mouret A. Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. *J Neurosci* 2008; 28: 11511–11516.
- Mu Y, Gage FH. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2011 Dec 22;6:85.
- Mudo G, Belluardo N, Mauro A, Fuxe K. Acute intermittent nicotine treatment induces fibroblast growth factor-2 in the subventricular zone of the adult rat brain and enhances neuronal precursor cell proliferation. *Neuroscience* 2007; 145: 470–483.
- Mudo G, Bonomo A, Di Liberto V, Frinchi M, Fuxe K, Belluardo N. The FGF-2/FGFRs neurotrophic system promotes neurogenesis in the adult brain. *J Neural Transm* 2009 Aug;116(8):995-1005.
- Murase S, Horwitz AF. Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J Neurosci* 2002; 22: 3568-3579.

N

- Nacher J, Crespo C, McEwen BS. Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur J Neurosci* 2001 Aug;14(4):629-44.
- Nagahara AH, Tuszynski MH. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nature Rev Drug Discov* 2011; 10: 209–219.
- Nam SC, Kim Y, Dryanovski D. Dynamic features of postnatal subventricular zone cell motility: a two-photon time-lapse study. *J Comp Neurol* 2007; 505: 190-208.
- Nakanishi M, Niidome T, Matsuda S, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H. Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *Eur J Neurosci* 2007; 25(3): 649-58.
- Nicolas CS, Amici M, Bortolotto ZA, Doherty A, Csaba Z, Fafouri A, Dournaud P, Gressens P, Collingridge GL, Peineau S. The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *JAKSTAT* 2013; 2(1): e22925.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2006 Sep;7(9):697-709.

Bibliografía

- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 2001; 409: 714–720.
- Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 2004; 7: 136–44.
- Nomura T, Goritz C, Catchpole T, Henkemeyer M, Frisen J. EphB signaling controls lineage plasticity of adult neural stem cell niche cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 730–743.

O

- O'Keeffe GC, Barker RA. Dopamine stimulates epidermal growth factor release from adult neural precursor cells derived from the subventricular zone by a disintegrin and metalloprotease. *Neuroreport* 2011 Dec 21;22(18):956-8.
- Okano HJ, Pfaff DW, Gibbs RB. Expression of EGFR-, p75NGFR-, and PSTAIR (cdc2)-like immunoreactivity by proliferating cells in the adult rat hippocampal formation and forebrain. *Dev Neurosci* 1996; 18: 199–209.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247–257.
- Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 2011;29:71-109.

P

- Packer MA, Stasiv Y, Benraiss A, Chmielnicki E, Grinberg A, Westphal H, Goldman SA, Enikolopov G. Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Aug 5;100(16):9566-71.
- Palma V, Ruiz I, Altaba A. Hedgehog-Gli signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development* 2004; 131:337-45.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 2000 Oct 2;425(4):479-94.
- Paratcha G, Ibáñez CF, Ledda F. GDNF is a chemoattractant factor for neuronal precursor cells in the rostral migratory stream. *Mol Cell Neurosci* 2006; 31: 505-514.
- Parras CM, Galli R, Britz O, Soares S, Galichet C, Battiste J, Johnson JE, Nakafuku M, Vescovi A, Guillemot F. Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO J* 2004; 23: 4495–4505.

Bibliografía

- Pastrana E, Cheng LC, Doetsch F. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl.Acad Sci USA* 2009; 106: 6387–6392.
- Paludan SR, Lovmand J, Ellermann-Eriksen S, Mogensen SC. Effect of IL-4 and IL-13 on IFN-gamma-induced production of nitric oxide in mouse macrophages infected with herpes simplex virus type 2. *FEBS Letters* 1997; 414: 61–4.
- Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB. Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp Neurol* 2001; 172: 1-16.
- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 2001; 21: 6706–6717.
- Peretto P, Merighi A, Fasolo A, Bonfanti L. Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res Bull* 1997; 42(1): 9-21.
- Peretto P, Merighi A, Fasolo A, Bonfanti L. The subependymal layer in rodents: a site of structural plasticity and cell migration in the adult mammalian brain. *Brain Res Bull* 1999; 49: 221–243.
- Pérez-Asensio FJ, Perpiñá U, Planas AM, Pozas E. Interleukin-10 regulates progenitor differentiation and modulates neurogenesis in adult brain. *J Cell Sci* 2013 Sep 15; 126(Pt 18):4208-19.
- Pérez-de Puig I, Miró F, Salas-Perdomo A, Bonfill-Teixidor E, Ferrer-Ferrer M, Márquez-Kisinousky L, Planas AM. IL-10 deficiency exacerbates the brain inflammatory response to permanent ischemia without preventing resolution of the lesion. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013 Dec;33(12):1955-66.
- Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:929-79. Review.
- Peterson DA. Quantitative histology using confocal microscopy: implementation of unbiased stereology procedures. *Methods*. 1999 Aug;18(4):493-507.
- Petreanu L, Álvarez-Buylla A. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 2002; 22: 6106-6113.
- Petryniak MA, Potter GB, Rowitch DH, Rubenstein JL. Dlx1 and Dlx2 control neuronal versus oligodendroglial cell fate acquisition in the developing forebrain. *Neuron* 2007; 55(3):417-33.
- Ponti G, Obernier K, Álvarez-Buylla A. Lineage progression from stem cells to new neurons in the adult brain ventricular-subventricular zone. *Cell Cycle* 2013 1; 12(11): 1649-50.

Bibliografía

- Porlan E, Morante-Redolat JM, Marqués-Torrejón MÁ, Andreu-Agulló C, Carneiro C, Gómez-Ibarlucea E, Soto A, Vidal A, Ferrón SR, Fariñas I. Transcriptional repression of Bmp2 by p21(Waf1/Cip1) links quiescence to neural stem cell maintenance. *Nat Neurosci* 2013 Nov;16(11):1567-75.
- Purves D, George J. Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony-Samuel LaMantia, James Q. McNamara, S. Mark Williams. *Neuroscience*, Third edition, 2004. Sinauer Associates, Inc, Publishers.

Q

- Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA, Temple S. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 2000; 28: 69-80.

R

- Rady PL, Cadet P, Bui TK, Tying SK, Baron S, Stanton GJ, Hughes TK. Production of interferon messenger RNA by cells of nonimmune origin. *Cytokine* 1995; 7: 793–798.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 1999 Jul; 30(1): 77-105. Review.
- Ramírez-Castillejo C, Sánchez-Sánchez F, Andreu-Agulló C, Ferrón SR, Aroca-Aguilar JD, Sánchez P, Mira H, Escribano J, Fariñas I. Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* 2006 Mar;9(3):331-9. Epub 2006 Feb 19.
- Raponi E, Agenes F, Delphin C, Assard N, Baudier J, Legraverend C, Deloulme JC. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia* 2007; 55: 165–177.
- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255: 1707–1710.
- Reznikov KY. Cell proliferation and cytogenesis in the mouse hippocampus. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 1991;122:1-74.
- Ribak CE, Korn MJ, Shan Z, Obenaus A. Dendritic growth cones and recurrent basal dendrites are typical features of newly generated dentate granule cells in the adult hippocampus. *Brain Res* 2004 Mar 12;1000(1-2):195-9.
- Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 2007; 317: 372–376.
- Rola R, Raber J, Rizk A, Otsuka S, VandenBerg SR, Morhardt DR, Fike JR. Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Exp Neurol* 2004; 188(2): 316–330.

Bibliografía

- Ruiz I, Altaba A, Palma V, Dahmane N. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 2002; 3, 24-33.
- Russo RE, Fernandez A, Reali C, Radmilovich M, Trujillo-Cenoz O. Functional and molecular clues reveal precursor-like cells and immature neurones in the turtle spinal cord. *J Physiol (Lond)* 2004; 560: 831–838.
- Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL, Werther GA. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr Rev* 2005; 26: 916-943.

S

- Sauvageot CM, Stiles CD. Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 2002 Jun;12(3):244-9.
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 2006; 311: 629–632.
- Schmitz T, Chew LJ. Cytokines and myelination in the central nervous system. *Sci World J* 2008; 8: 1119–1147.
- Schwartz M, Shechter R. Systemic inflammatory cells fight off neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2010 Jul; 6(7): 405-10.
- Seki T, Arai Y. Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci Res* 1993; 17: 265–290.
- Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Álvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 2001 Sep 15; 21(18): 7153-60.
- Sharp FR, Liu J, Bernabeu R. Neurogenesis following brain ischemia. *Brain Res Dev Brain Res* 2002; 134(1-2):23-30. Review.
- Shen Q, Wang Y, Dimos JT, Fasano CA, Phoenix TN, et al. The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat Neurosci* 2006; 9: 743–751.
- Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: A quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 289–300.
- Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 2001 Dec 15; 21(24): 9733-43.

Bibliografía

- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 2001 Mar 15; 410(6826): 372-6.
- Shou J, Rim PC, Calof AL. BMPs inhibit neurogenesis by a mechanism involving degradation of a transcription factor. *Nat Neurosci* 1999; 2: 339–345.
- Siebzehnruhl FA, Buslei R, Eyupoglu IY, Seufert S, Hahnen E, Blumcke I. Histone deacetylase inhibitors increase neuronal differentiation in adult forebrain precursor cells. *Exp Brain Res* 2007; 176: 672-8.
- Sims JR, Lee SW, Topalkara K, Qiu J, Xu J, Zhou Z, Moskowitz MA. Sonic hedgehog regulates ischemia/hypoxia-induced neural progenitor proliferation. *Stroke* 2009 Nov; 40(11):3618-26.
- Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR., McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 1998; 585–589.
- Singla V, Reiter JF. The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* 2006; 313: 629–633.
- Snapyan M, Lemasson M, Brill MS. Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 2009; 29: 4172-4188.
- Soliman F. A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. *Science* 2010; 327: 863–866.
- Song HJ, Stevens CF, Gage FH. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci* 2002 May; 5(5): 438-45.
- Soria JM, Tagliabatella P, Gil-Perotin S. Defective postnatal neurogenesis and disorganization of the rostral migratory stream in absence of the *Vax1* homeobox gene. *J Neurosci* 2004; 24: 11171-11181.
- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 2005; 25: 10–18.
- Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev.* 1992 Apr;99(2):195-231. Review. Erratum in: *Psychol Rev* 1992 Jul;99(3):582.
- Spera PA, Ellison JA, Feuerstein GZ, Barone FC. IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. *Neurosci Lett* 1998 Jul 31;251(3):189-92.
- Spires, T. L. Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism. *J Neurosci* 2004; 24: 2270–2276.

Bibliografía

- Spooren A, Kolmus K, Laureys G, Clinckers R, De Keyser J, Haegeman G, Gerlo S. Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Res Rev* 2011; 67: 157–183.
- Stanfield BB, Trice JE. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res* 1988; 72(2): 399-406.
- Streit WJ. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 2002 Nov; 40(2): 133-9. Review
- Sultan S. Learning-dependent neurogenesis in the olfactory bulb determines long-term olfactory memory. *FASEB J* 2010; 24: 2355–2363.
- Sun G, Yu RT, Evans RM, Shi Y. Orphan nuclear receptor TLX recruits histone deacetylases to repress transcription and regulate neural stem cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15282–15287.
- Sun Y, Jin K, Childs JT, Xie L, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: Evidence from knockout mice and growth factor administration. *Dev Biol* 2006; 289: 329–335.

T

- Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, García-Verdugo JM, Doetsch F. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 279–288.
- Taylor MK, Yeager K, Morrison SJ. Physiological Notch signaling promotes gliogenesis in the developing peripheral and central nervous systems. *Development* 2007; 134: 2435-47.
- Theus MH, Ricard J, Bethea JR, Liebl DJ. EphB3 limits the expansion of neural progenitor cells in the subventricular zone by regulating p53 during homeostasis and following traumatic brain injury. *Stem Cells* 2010; 28: 1231-42.
- Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 2006 Mar;24(3):739-47.
- Thored P, Heldmann U, Gomes-Leal W, Gisler R, Darsalia V, Taneera J, Nygren JM, Jacobsen SE, Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia* 2009; 57: 835–849.
- Torroglosa A, Murillo-Carretero M, Romero-Grimaldi C, Matarredona ER, Campos-Caro A, Estrada C. Nitric oxide decreases subventricular zone stem cell proliferation by inhibition of epiderma growth factor receptor and phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway. *Stem Cells* 2007; 25(1):88–97.

Bibliografía

- Tozer S, Le Dréau G, Marti E, Briscoe J. Temporal control of BMP signalling determines neuronal subtype identity in the dorsal neural tube. *Development* 2013 Apr; 140(7): 1467-74.
- Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. The origin of adult neural stem cells. *Soc Neurosci Abstr* 2002; 525: 2.
- Trejo J, Cairo E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 2001; 21: 1628–1634.
- Triaca V, Tirassa P, Aloe L. Presence of nerve growth factor and TrkA expression in the SVZ of EAE rats: Evidence for a possible functional significance. *Exp Neurol* 2005; 191: 53–64.
- Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, van der Kooy D. Transforming growth factor- α null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci* 1997; 17: 7850–7859.

V

- Vallières L, Campbell IL, Gage FH, Sawchenko PE. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci* 2002; 22: 486–492.
- Vila N, Castillo J, Dávalos A, Esteve A, Planas AM, Chamorro A. Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke. *Stroke* 2003 Mar;34(3):671-5.
- Voigt T. Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J Comp Neurol* 1989; 289:74–88.

W

- Walter J, Honsek SD, Illes S, Wellen JM, Hartung HP, Rose CR, Dihné M. A new role for interferon gamma in neural stem/precursor cell dysregulation. *Mol Neurodegener* 2011; Mar 3;6:18.
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 2007; 184(1-2): 53–68.
- Wang YQ, Jin K, Mao XO, Xie L, Banwait S, Marti HH, Greenberg DA. VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration. *J Neurosci Res* 2007b; 85: 740–747.
- Wei YP, Kita M, Shinmura K, Yan XQ, Fukuyama R, Fushiki S, Imanishi J. Expression of IFN γ in cerebrovascular endothelial cells from aged mice. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20: 403– 409.

Bibliografía

- Wentz CT, Magavi SS. Caffeine alters proliferation of neuronal precursors in the adult hippocampus. *Neuropharmacology* 2009; 56: 994–1000.
- Wetmore C, Ernfors P, Persson H, Olson L. Localization of brain-derived neurotrophic factor mRNA to neurons in the brain by in situ hybridization. *Exp Neurol* 1990 Aug; 109(2): 141-52.
- Whitman MC, Fan W, Relat L, Rodriguez-Gil DJ, Greer CA. Blood vessels form a migratory scaffold in the rostral migratory stream. *J Comp Neurol* 2009; 516: 94-104.
- Whitman MC, Greer CA. Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol* 2009; 89: 162-175.
- Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 2009; 108(6): 1343–1359.
- Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* 1997 May; 18(5): 779-91.
- Williams RL. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988; 336: 684–687.
- Wittko IM, Schänzer A, Kuzmichev A. VEGFR-1 regulates adult olfactory bulb neurogenesis and migration of neural progenitors in the rostral migratory stream in vivo. *J Neurosci* 2009; 29: 8704-8714.
- Wong G, Goldshmit Y, Turnley AM. Interferon-gamma but not TNF alpha promotes neuronal differentiation and neurite outgrowth of murine adult neural stem cells. *Exp Neurol* 2004; 187: 171–177.
- Wu H, Coskun V, Tao J, Xie W, Ge W, Yoshikawa K, Li E, Zhang Y, Sun YE. Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science* 2010a; 329: 444–448.

X

- Xia YP, He QW, Li YN, Chen SC, Huang M, Wang Y, Gao Y, Huang Y, Wang MD, Mao L, Hu B. Recombinant human sonic hedgehog protein regulates the expression of ZO-1 and occludin by activating angiotensin-1 in stroke damage. *PLoS One* 2013 Jul 23; 8(7):e68891.
- Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998 Jan 15; 101(2): 311-20.

Y

Bibliografía

- Yan YP, Sailor KA, Lang BT, Park SW, Vemuganti R, Dempsey RJ. Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia. *Dev Biol* 2006 Jan 15;289(2):329-35.
- Yang HK, Sundholm-Peters NL, Goings GE, Walker AS, Hyland K, Szele FG. Distribution of doublecortin expressing cells near the lateral ventricles in the adult mouse brain. *J Neurosci Res* 2004; 76: 282–295.
- Yang J, Jiang Z, Fitzgerald DC, Ma C, Yu S, Li H, Zhao Z, Li Y, Ciric B, Curtis M, Rostami A, Zhang GX. Adult neural stem cells expressing IL-10 confer potent immunomodulation and remyelination in experimental autoimmune encephalitis. *The Journal of Clinical Investigation* 2009; 119: 3678-3691
- Yang P, Arnold SA, Habas A, Hetman M, Hagg T. Ciliary neurotrophic factor mediates dopamine D2 receptor-induced CNS neurogenesis in adult mice. *J Neurosci* 2008; 28: 2231–2241.
- Yoon K, Gaiano N. Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci* 2005; 709–715.
- Young KM, Fogarty M, Kessar N, Richardson WD. Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 2007; 27:8286–8296.
- Yu IT, Park JY, Kim SH, Lee JS, Kim YS, Son H. Valproic acid promotes neuronal differentiation by induction of proneural factors in association with H4 acetylation. *Neuropharmacology* 2009; 56: 473–480.
- Yu JM, Kim JH, Song GS, Jung JS. Increase in proliferation and differentiation of neural progenitor cells isolated from postnatal and adult mice brain by Wnt-3a and Wnt-5a, *Mol Cell Biochem* 2006; 288: 17–28.

Z

- Zahir T, Chen YF, MacDonald JF, Leipzig N, Tator CH, Shoichet MS. Neural stem/progenitor cells differentiate in vitro to neurons by the combined action of dibutyryl cAMP and interferon-gamma. *Stem Cells Dev* 2009 Dec; 18(10):1423-32.
- Zhang L, Chopp M, Meier DH, Winter S, Wang L, Szalad A, Lu M, Wei M, Cui Y, Zhang ZG. Sonic hedgehog signaling pathway mediates cerebrolysin-improved neurological function after stroke. *Stroke* 2013 Jul;44(7):1965-72.
- Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, Chopp M. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 2001; 105(1): 33–41.
- Zhong W, Chia W. Neurogenesis and asymmetric cell division. *Curr Opin Neurobiol* 2008; 18: 4–11.

Bibliografía

- Zigova T, Pencea V, Betarbet R. Neuronal progenitor cells of the neonatal subventricular zone differentiate and disperse following transplantation into the adult rat striatum. *Cell Transplant* 1998; 7: 137-156.
- Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 1996; 86: 599–606.
- Zou DJ, Chesler A, Firestein S. How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story? *Nat Rev Neurosci* 2009 Aug;10(8):611-8.
- Zupanc GK. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *J Comp Physiol A*. 2006; 192: 649–70.