

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA



Determinación de la neurogénesis en la médula espinal en un modelo murino de trauma inducido por compresión mecánica

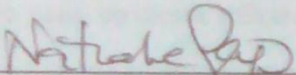
Trabajo Especial de Grado por Maxs Méndez Ruelle

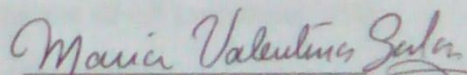
Tutor: Carlos A. Ayala-Grosso, MSc, PhD

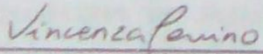
**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL Br. Maxs Méndez Ruelle**

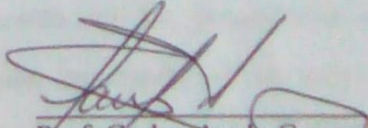
Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Maxs Méndez Ruelle, C.I: 20.613.403, titulado **"Determinación de la neurogénesis en la médula espinal en un modelo murino de trauma inducido por compresión mecánica"**, para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 20 días del mes de octubre del año 2016, dejando constar que la Prof. Vicenza Cervino actuó como coordinadora del jurado examinador.


Prof. Natalie Gago


Prof. Valentina Salas


Prof. Vicenza Cervino
(Coordinador)


Prof. Carlos Ayala Grosse
(Tutor)

RESUMEN

Actualmente un estimado de 5,3 millones de personas viven alrededor del mundo con lesiones crónicas en la médula espinal, registrándose cada año 80000 nuevos casos.

El descubrimiento de progenitores residentes en la médula espinal adulta abre la posibilidad del desarrollo de nuevos tratamientos que modulen la diferenciación de estas células, con el objeto de reestablecer los tipos celulares que promuevan la recuperación de las funciones afectadas.

En este estudio se exploró la función neurogénica en la médula espinal intacta y su capacidad de proliferación en un modelo murino sometido a un trauma de la médula espinal por compresión (T9), todo ello mediante la utilización del marcador BrdU. Así mismo, se logró la caracterización de los tipos celulares en proliferación para cada condición utilizando para esto los marcadores GFAP (astrocitos), NG2 (progenitores de oligodendrocitos) y nestina (células endodiales).

Los resultados demostraron un aumento en el aporte proliferativo de astrocitos y células de la capa endodial en las regiones cervical y torácica luego de la lesión, evidenciando la influencia que tiene una región lesionada sobre otra. Por otro lado, la generación de la lesión no produce un aumento en los progenitores de oligodendrocitos en ninguna de las dos regiones, resultando nocivo para la remielinización de los axones dañados. Finalmente, el modelo de compresión lateral aplicado en este trabajo logró el establecimiento de ratones con lesiones crónicas, abriendo la posibilidad del estudio de la neurogénesis no solo durante el desarrollo de la lesión, sino en etapas donde ya no están presentes factores los inflamatorios.

LISTA DE ABREVIATURAS

BrdU: bromodesoxiuridina.

CD133: marcador de células madre; también conocido como prominina-1.

CNS: sistema nervioso central, por sus siglas en inglés: *central nervous system*.

DAB: diaminobencidina.

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

EGF: factor de crecimiento epidérmico, por sus siglas: *epidermal growth factor*.

EpCs: células endodiales, por sus siglas en inglés: *ependymal cells*.

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos, por sus siglas en inglés: *fibroblast growth factor*.

GFAP: proteína ácida fibrilar glial, por sus siglas en inglés: *glial fibrillary acidic protein*.

GFP: Proteína fluorescente verde, por sus siglas en inglés: *green fluorescent protein*.

NSCs: células madre neurales, por sus siglas en inglés: *neural stem cells*.

Olig2: factor de transcripción de oligodendrocitos, por sus siglas en inglés: *oligodendrocyte transcription factor*.

S100 β : proteína B de unión al calcio, marcador de astrocitos.

MB: materia o sustancia blanca

MG: materia o sustancia gris

Sox2: factor de transcripción cuya función es esencial en el mantenimiento de la auto-renovación de las células madre embrionarias no diferenciadas, por sus siglas en inglés: *Sex determining Region*.

Sox9: del inglés: SRY (sex determining region Y)-box 9

SVZ: zona subventricular, por sus siglas en inglés: *subventricular zone*.

INDICE

Resumen

Lista de abreviaturas

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 La neurogénesis de la médula espinal durante el desarrollo.....	9
1.2 La neurogénesis de la médula espinal en el animal adulto.....	11
1.3 Neurogénesis y trauma de la médula espinal.....	13
1.4 Las células madre en la médula espinal.....	15
2. ANTECEDENTES	16
2.1 La proliferación y diferenciación de progenitores en la médula espinal.....	17
2.2 La neurogénesis en la médula espinal lesionada.....	19
2.3 Las células madre neurales de médula espinal en cultivos in vitro.....	21
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo general.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4. MATERIALES Y METODOS	25
4.1 Animales de experimentación.....	25
4.2 Inducción de lesión de la médula espinal en T9.....	25
4.3 Determinación de la proliferación celular de la médula espinal de animales intactos.....	28
4.4 Determinación de la proliferación celular en la médula espinal lesionada por compresión.....	28

4.5 Fijación del tejido medular por perfusión intracardial.....	29
4.6 Obtención de secciones transversales de médula espinal.....	30
4.7 Determinación de las células en proliferación y su fenotipo mediante técnicas de inmunohistoquímica.....	30
4.7.1 Estimación de células en proliferación.....	30
4.7.2 Caracterización fenotípica de las células en proliferación.....	32
4.8 Procesamiento de las imágenes.....	33
4.9 Análisis de las imágenes.....	34
5. RESULTADOS	36
5.1 Evaluación conductual de animales lesionados por compresión medular.....	36
5.2 Determinación de la proliferación celular en la médula espinal intacta.....	37
5.2.1 Análisis de la densidad celular en MB y MG.....	38
5.2.2 Análisis de la densidad celular en MB y MG (Día 7).....	38
5.3 Caracterización de progenitores en médula espinal intacta.....	41
5.3.1 Células ependimales.....	41
5.3.2 Atrocitos.....	44
5.3.3 Oligodendrocitos.....	47
5.3.4 Comparación de células en proliferación en médula espinal intacta.....	49
5.4 Estimación de la proliferación en médula espinal lesionada.....	51
5.5 Caracterización de los progenitores en médula espinal lesionada.....	51
5.5.1 Células ependimales.....	51
5.5.2 Astrocitos.....	53
5.5.3 Oligodendrocitos.....	54
5.5.4 Comparación de células en proliferación en médula espinal lesionada...	55
5.6 Estimación de la proliferación en médula espinal intacta y lesionada mediante el marcador KI67.....	56

6. DISCUSIÓN	58
6.1 Estimación del curso temporal del síndrome parapléjico.....	59
6.2 Estimación de la proliferación en médula espinal intacta.....	58
6.2.1 Análisis de la densidad celular en MB y MG.....	61
6.2.2 Análisis de la densidad celular en MB y MG (Día 7).....	61
6.3 Caracterización de los progenitores en la médula espinal intacta.....	62
6.3.1 Células ependimales.....	62
6.3.2 Astroцитos.....	64
6.3.3 Oligodendrocitos.....	66
6.3.4 Comparación entre células en proliferación.....	67
6.4 Estimación de la proliferación celular en médula espinal lesionada.....	67
6.5 Caracterización de los progenitores en la médula espinal lesionada.....	69
6.5.1 Células ependimales.....	69
6.5.2 Astroцитos.....	72
6.5.3 Oligodendrocitos.....	73
6.5.4 Comparación entre células en proliferación.....	74
6.6 Estimación de la proliferación en médula espinal intacta y lesionada mediante el marcador KI67.....	75
 7. CONCLUSIONES	 77
 8. BIBLIOGRAFIA	 78
 9. ANEXOS	 82

1. INTRODUCCIÓN

La médula espinal constituye la porción caudal del sistema nervioso central (SCN) que se extiende desde la parte baja del tallo cerebral hasta la cauda equina. Se localiza dentro del canal vertebral en el eje central del cuerpo y su ubicación topográfica la coloca como un centro de relevo de la información sensorial proveniente de los músculos, órganos y piel (función aferente). Alberga a su vez los circuitos de motoneuronas responsables de los movimientos voluntarios y reflejos, así como aquellos encargados de coordinar al sistema nervioso autónomo. La médula espinal se encuentra recubierta en toda su extensión por las meninges piamadre, aracnoides y duramadre (localizadas desde la superficie más interna a la más externa, respectivamente). En una sección transversal de médula espinal es apreciable una sustancia gris, constituida por motoneuronas e interneuronas que integran los circuitos medulares; una sustancia blanca, constituida por los axones ascendentes y descendentes; y un canal central o región ependimal, recubierta por un epitelio que genera el líquido cefalorraquídeo proveniente del plexo coroideo alojado en los ventrículos cerebrales.

Puesto que la médula espinal es la vía de comunicación principal para la actividad motora, sensorial y vegetativa (sistema nervioso simpático y parasimpático), una perturbación en su arquitectura conlleva a defectos en múltiples funciones. Las lesiones de médula espinal (SCI) son heterogéneas, su efecto sobre la actividad motora y sensorial depende de los circuitos neurales que hayan sido afectados; así, el daño puede perturbar exclusivamente a la duramadre, alterar la distribución de líquido cefalorraquídeo en el espacio subaracnoideo y/o influir directamente sobre la piamadre y la médula propiamente dicha. En este último caso, una lesión provocada

sobre el tejido nervioso conlleva a una pérdida de los oligodendrocitos que recubren los axones (Crowe, 1997; Grossman, 2001). La lesión de los axones interfiere directamente con su capacidad de conducción y procesamiento de la información sensorial y motora; otros procesos secundarios derivados de actividad inflamatoria, como la invasión de células inmunológicas reactivas y liberación de moléculas inductoras de la apoptosis, así como la formación de una cicatriz generada por las células gliales, también pueden influenciar negativamente la transmisión de los impulsos nerviosos.

Los circuitos existentes en la médula espinal son susceptibles a remodelación; estos presentan adaptación dependiente de la actividad, lo que contribuye a la generación de las interconexiones que permiten la adquisición y mantenimiento de las capacidades motoras (plasticidad) a lo largo del tiempo (Thuret y col., 2006). La aplicación de terapias de *rehabilitación física* ofrece una ventaja para la recuperación de la función motora y sensorial del paciente; el mecanismo de acción permanece en discusión, pues la heterogeneidad de las poblaciones neuronales en la médula y sus respuestas específicas a estímulos aferentes dificulta identificar los procesos encargados de direccionar la plasticidad a nivel medular.

En cuanto a las intervenciones *terapéuticas experimentales*, donde se utilizan implantes celulares luego de un daño espinal, la administración *in situ* de células de Schwann, oligodendrocitos, células madre embrionarias, células madre neurales (NSC) y células de la mucosa olfatoria cultivadas *in vitro*, ha conllevado resultados positivos en la remielinización de los axones, así como en la recuperación parcial de la actividad motora del individuo (Thuret y col., 2006).

Por otra parte, el descubrimiento de células madre neurales en la médula espinal del individuo adulto (Barnabé-Heider y col., 2010) ha dirigido las investigaciones al desarrollo de estrategias terapéuticas para inducir su proliferación y diferenciación *in vivo* a tipo celulares que permitan la reparación de los circuitos afectados. Así, se ha comprobado que la utilización de un precursor neuronal aumenta la supervivencia, migración y diferenciación hacia fenotipos neuronales, los que se traduce en una recuperación en el desempeño motor de los animales (Lepore y Fischer, 2005; Mitsui y col. 2005; Silva y col., 2014).

El cultivo *in vitro* de las células endodermales ha demostrado la capacidad de producir oligodendrocitos, astrocitos y neuronas; la estrategia consiste en inducir la diferenciación de las células *in vivo* para la producción de oligodendrocitos en pro de la recuperación de la vaina de mielina (Gregorian y col., 2009), aumentando la posibilidad de retransmisión de los impulsos a lo largo del sitio de lesión.

1.1 La neurogénesis en la médula espinal durante el desarrollo

Durante el desarrollo, el embrión posee tres capas germinales distintas: endodermo, mesodermo y ectodermo. La primera de ellas deriva en la formación de los órganos viscerales, la segunda en huesos y músculos, y la tercera en la piel y sistema nervioso. En los primeros días del embrión el ectodermo desarrolla la placa neural; esto ocurre debido a que las células presentes en la periferia de esta estructura poseen un alto índice de proliferación, lo que conlleva a la formación del plegamiento que derivará en el tubo neural. Los somitas, procedentes del mesodermo, proliferan alrededor del tubo y constituirán las vértebras y los músculos esqueléticos espinales. El tubo neural posee una cavidad ventricular por donde circula el fluido cerebroespinal

(CSF); la zona frontal y media de su morfología da lugar al cerebro anterior (prosencéfalo), medio (mesencéfalo) y posterior (rombencéfalo), mientras que la zona caudal da origen al tallo cerebral y a la médula espinal (Copp y col., 1990). En la etapa embrionaria existen precursores neurales residentes en la capa luminal del cerebro anterior que migran a la zona subventricular (SVZ) en donde actuarán como los sitios neurogénicos en el cerebro del adulto (Gritti y col., 2002).

En muchas regiones del SNC las capas germinales desaparecen en la etapa adulta, quedando una monocapa de células ciliadas endodurales (EpCs) que tapizan los ventrículos cerebrales y el canal central medular (Del-Bigio, 1995); el origen de estas células deriva de los progenitores gliales radiales durante el desarrollo embrionario, así como en dos haces de fibras delgadas radiales provenientes de las placas superior e inferior del tubo neural (Oudega y Marani, 1991; Shibata y col., 1997), lo que explica la heterogeneidad morfológica existente en este tejido. Las EpCs cerebrales y medulares son derivadas del neuroepitelio, pero poseen un destino final diferente: en el cerebro juegan un papel en la creación y mantenimiento de la neurogénesis en el SVZ; allí secretan nogina, péptido que neutraliza el efecto inhibitorio de la proteína morfogenética ósea (BMP) (Lim y col., 2000; Bauer y col., 2006). Durante una lesión en la corteza, las células endodurales positivas para el marcador CD133⁺ son activadas y transformadas en células gliales radiales, actuando así como células madre neurales en el tejido adulto (Zhang y col., 2007; Coskun y col., 2008). A nivel medular, las EpCs, permanecen quiescentes en condiciones normales, aumentando su tasa de proliferación y diferenciación posterior al daño tisular (Meletis y col., 2008; Goritz y Frisen, 2012)

1.2 La neurogénesis de la médula espinal en el animal adulto

Se ha sugerido que los progenitores de oligodendrocitos (OPCs), astrocitos y células endodimales proliferan en la médula espinal adulta (Horner y col., 2000; Johansson y col., 1999; Martens y col., 2002; Meletis y col., 2008; Ohori y col., 2006). Las EpCs poseen varios subtipos morfológicamente identificables [EpCs cuboidales, tanocíticas y EpCs radiales (Peters y col., 1991) derivadas del desarrollo de las células embrionarias neuroepiteliales del tubo neural ventral (Meletis y col., 2008). Estas células se auto renuevan *in vivo*, pero no generan otros tipos celulares bajo condiciones homeostáticas.

La proliferación de las **células endodimales** se incrementa significativamente después de una lesión medular, seguido por la migración de las EpCs al sitio de daño (Johansson y col., 1999) y su posterior diferenciación en oligodendrocitos o astrocitos (Meletis y col., 2008). El mecanismo que explica el cambio en la proliferación permanece en discusión (Moreno-Manzano y col., 2009; Xu y col., 2006) aunque se ha sugerido la participación de moléculas de señalización derivadas de la inflamación y de la activación de macrófagos.

La utilización de ratones transgénicos, en los que la expresión de Cre recombinasa (CreER) está bajo el control de promotores específicos, permite obtener más información acerca de los marcadores intrínsecos de estos tipos celulares. En este caso, el manejo del promotor FoxJ1, característico de las células ciliadas motiles, recombina únicamente en células con expresión de vimentina, nestina, Musashi-1 y Sox9, todas estas proteínas se expresan preferencialmente en las células endodimales (Meletis y col., 2008).

En adición a las EpCs como especie neurogénica, existen **progenitores de oligodendrocitos** (OPCs, NG2⁺ cells, ploidendocitos) residentes en la materia blanca y gris de la médula espinal adulta los cuales parecen diferenciarse en múltiples linajes *in vivo* (Horky y col., 2006; Ohori y col., 2006; Sellers y col., 2009). La identificación de esta especie ha sido realizada con ayuda del marcador NG2 (antígeno neural/glial 2), ya sea mediante inmunohistoquímica (Horner y col., 2000) o el uso de pruebas de expresión genética (Cahoy y col., 2008). Otros marcadores como PDGFR α (factor de crecimiento derivado de plaquetas) también muestran reactividad contra este fenotipo. Toda la línea celular de oligodendrocitos (progenitores –OPCs-, oligodendrocitos postmitóticos premielinizantes –OLs- y oligodendrocitos mielinizados) expresan el promotor/marcador Olig2 (Yamamoto y col., 2001; Nishiyama y col., 2009).

El promotor conexina 30 (Cx30), que codifica una proteína de unión Gap, se encuentra únicamente en **astrocitos** del SNC (Nagy y col., 1999; Rash y col., 1992); este péptido es coexpresado junto a los marcadores Sox9 (factor de transcripción), S100 β y GFAP (proteína acidica fibrilar) característicos de la línea celular (Cahoy y col., 2008; Barnabé-Heider y col., 2010). Se plantea la existencia de tres subtipos de astrocitos a nivel medular: uno en la materia blanca, con expresión de Sox9, altos niveles de GFAP y ausencia de Olig2 y dos más en la materia gris. Estos dos últimos, localizados muy cerca de la capa ependimal, expresan morfología Sox9/GFAP⁺⁺⁺/Olig2⁻ y Sox9/GFAP⁺/Olig2⁺. La capacidad de esta línea parece estar limitada únicamente a generar su propio tipo celular (Barnabé-Heider y col., 2010).

Se resume en la Tabla 1 los marcadores utilizados para caracterizar cada una de las líneas celulares en trabajos relacionados con la neurogénesis en la médula espinal. Los fenotipos OLs y Myelin OLs son células diferenciadas no-proliferadoras.

RESUMEN DE MARCADORES UTILIZADOS PARA REALIZAR LA CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS EN MÉDULA

	1999 MIGHELI	2000 HORNER	2008 CAHOY MELETIS	2009 HAMILTON	2010 HEIDER	2011 RICHARDSON	2015 LEVINE
OPCs		NG2	NG2 PDGFR α S100 β		NG2	NG2 PDGFR α	NG2 PDGFR α Olig2
OLs (NO PROLIF)			S100 β NG2				
Myelin OLs (NO PROLIF)		RIP	MOG MBP		Olig2		Olig2
ASTROCITOS	S100 β	GFAP/APC S100 β			GFAP S100 β SOX9	GFAP	
EPENDIMALES			Vimentina Prominina SOX2 SOX3 Nestina Musashi-1	Vimentina S100 β SOX2 Nestina	Vimentina		

Tabla 1. Resumen de marcadores utilizados para realizar la caracterización de células en médula.

OPCs: células progenitoras de oligodendrocitos/ NG2⁺ cells/polidendrocitos; **OLs:** oligodendrocitos postmitóticos premielinizados; **Myelin OLs:** oligodendrocitos mielinizados. Marcadores: **S100 β :** proteína de unión a calcio; **RIP:** proteína receptora de interacción; **GFAP:** proteína ácida fibrilar; **MOG:** glicoproteína de oligodendrocitos mielinizados; **PDGFR α :** factor de crecimiento derivado de plaquetas; **NG2:** antígeno neural/glial 2.

1.3 La neurogénesis y el trauma de la médula espinal

En la médula espinal intacta los progenitores neurales están representados por tres tipos celulares: progenitores astrocíticos, oligodendrocíticos y ependimales; en estas circunstancias cada una de estas células tiene la capacidad de duplicarse y generar células hijas del mismo tipo celular que su progenitor. Así, en condiciones normales la tasa de proliferación tiene como función contribuir al mantenimiento de las poblaciones (Barnabé-Heider y col., 2010).

Las células ependimales se encuentran restringidas al canal central, pero posterior a una lesión medular se multiplican y desplazan desde hacía el sitio de daño generando cantidades limitadas de oligodendrocitos maduros Olig2⁺ y APC⁺ (Meletis y col., 2008). Al mismo tiempo, los astrocitos acumulados en la región afectada poseen dos subtipos: unos perimetrales al daño, derivados en su mayoría de progenitores de astrocitos, y otros en el núcleo de la región afectada, provenientes de la migración y diferenciación de las células ependimales. Así, un 39% de las nuevas células gliales proceden de esta diferenciación ependimal, mientras que 34 y 27% lo hacen de progenitores de astrocitos y oligodendrocitos respectivamente (Barnabé-Heider y col., 2010). El incremento en la proliferación de los progenitores astrocíticos y oligodendrocíticos después de una lesión conduce a la de nuevas células circunscritas a su mismo tipo celular (de modo similar a lo que ocurre en la médula intacta), mientras que las células ependimales, posterior a la lesión, muestran capacidad de proliferación y diferenciación en distintos tipos celulares (multipotencialidad), y por tanto, características de la célula madre neural (Figura 1).

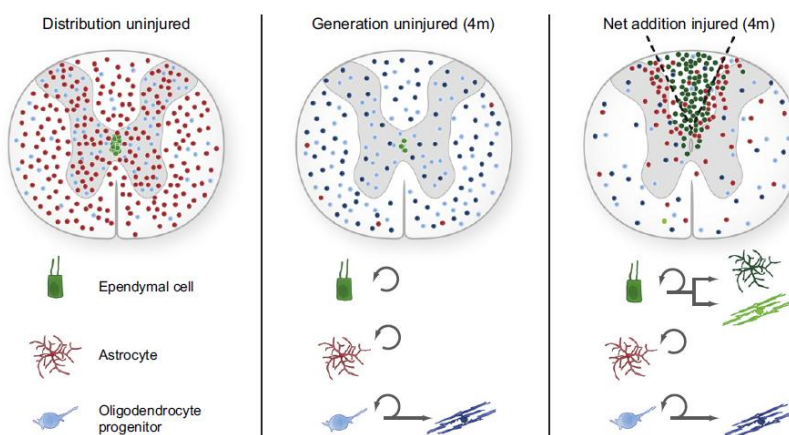


Figura 1. Contribución relativa de células ependimales, astrocitos y progenitores oligodendrocíticos a las nuevas células gliales en la médula espinal dorsal adulta (Barnabé-Heider y col., 2010). En la médula intacta las células ependimales solo se auto renuevan, mientras que tras una lesión estas son capaces de autorenovarse y producir astrocitos y oligodendrocitos maduros como progenie. Los progenitores de oligodendrocitos producen nuevos progenitores (auto renovación) de oligodendrocitos y también oligodendrocitos maduros

1.4 Las células madre en la médula espinal

Los marcadores Nestina, Musashi1, CD133, Sox2 y Vimentina, asociados a células madre nerviosas (NSC) (Frisen y col., 1995; Carlén y col., 2006; Corti y col., 2007), se expresan en los progenitores de las regiones neurogénicas clásicas del cerebro (Doetsch y col., 1999). Se ha demostrado que estos mismo marcadores se encuentran presentes en la capa ependimal de la médula espinal adulta (Tabla 2), infiriéndose la presencia de células progenitoras a nivel del canal central espinal de la médula espinal.

MARCADORES	SVZ	CC	MARCADOR ESPECIAL DE
Nestina	+	+	Progenitores indiferenciados y células madre
GFAP	+	+	Células madre neurales cerebrales y astrocitos
Sox2	+	+	Células madre neurales cerebrales
Musashi-1	+	+	Células madre neurales cerebrales
CD133/prominina-1	+	+	Células madre neurales cerebrales
Vimentina	+	+	Células ependimales cerebrales
S100B	+	+	Células ependimales cerebrales

Tabla 2. Comparación de expresión de marcadores característicos de células madre neurales en el subventrículo cerebral (SVZ) vs el canal ependimal de la espina dorsal adulta (Qin, 2015). SVZ: zona subventricular del cerebro. CC: canal central.

En presencia de mitógenos como EGF o FGF las células madre multipotentes se propagan a partir de preparaciones del tejido del SNC, formando neuroesferas, que son agregados de progenitores no diferenciados; estas estructuras no expresan aún proteínas adherentes o de matriz extracelular, por lo cual proliferan en cultivo como células no adherentes (Weiss y col., 1996). La utilización de cultivos neurales a partir de tejido espinal de ratones transgénicos permitió demostrar la presencia de progenitores en médula y establecer que la mayor parte de las neuroesferas derivan de la actividad proliferativa de las células ependimales; dichos cultivos muestran reactividad para los marcadores de NSC, así como su potencial de diferenciación en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Barnabé-Heider y col., 2010).

2. ANTECEDENTES

Hasta finales de los años 50, los estudios sobre la neurogénesis habían establecido que las células que conformaban el sistema nervioso central se desarrollaban únicamente durante el periodo embrionario y el periodo postnatal temprano. A principio de la década de los 60, Smart (1961), reportó actividad mitótica en las regiones subependimales de los ventrículos laterales cerebrales, sugiriendo la posible existencia de células progenitoras en dicha región; años después, Altman y Das (1965) demostraron la génesis neuronal y glial en el giro dentado del hipocampo en el roedor adulto.

La demostración de que el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y el factor de crecimiento epidermal (EGF) inducen la proliferación, autorrenovación y expansión de las NSC (Weiss y col., 1996) permitió la generación de cultivos multipotentes derivados de zonas específicas del SNC; con ello se pudo comprobar que las regiones neurogénicas descritas por Smart y Altman y Das, al ser aisladas y propagadas *in vitro* en presencia de EGF y bFGF, derivaban en la formación de NSCs en forma de neuroesferas (Lois y Alvarez-Buylla, 1993; Morshead y col., 1994; Weiss y col., 1996; Palmer y col., 1997).

El desarrollo de la cavidad ventricular precede en la formación del canal medular. Dado que las capas ependimales del cerebro y la médula tienen el mismo origen embrionario, la presencia de progenitores a nivel del tegumento ventricular supuso la existencia de proliferadores neurales en la región ependimal de la médula espinal.

2.1 La proliferación y diferenciación de progenitores en médula espinal

En 1962, Adrian y Walker utilizando ^3H -timidina, establecieron un pequeño grupo celular cercano al canal central en la médula espinal adulta. En 1999, Namiki y Tator, utilizaron el marcador KI67 (presente en las fases celulares activas) logrando identificar células en proliferación en la capa endotelial de la médula. En el año 2000, Horner y colaboradores comprobaron la existencia de progenitores neurales a nivel de la capa endotelial; para ello administraron a ratones durante 12 días bromodesoxiuridina (BrdU 50mg/kg). Con este diseño experimental se observó un incremento del número de células marcadas con BrdU a día 1, y 4 semanas post-administración, confirmando la presencia de células en división. La observación de la distribución de las células marcadas en la médula a las 4 semanas post-administración permitió establecer una migración limitada entre las zonas del parénquima medular. Así, en la médula intacta, existe una proliferación restringida en la capa endotelial y una migración nula de este grupo celular hacia otras partes de la estructura. En el mismo trabajo, Horner y colaboradores, describieron que el marcador NG2 (característico de progenitores gliales) se coexpresaba en más del 70% de la población celular positiva para BrdU, indicando que la mayoría de las células en división eran células gliales inmaduras; cabe destacar que trabajos posteriores (Cahoy y col., 2008) demostraron que estas células NG2⁺ (células NG2⁺) son progenitores de oligodendrocitos, cayendo en desuso la terminología progenitor glial.

La utilización de nuevos marcadores para células endoteliales y NSC, junto al desarrollo de ratones transgénicos con promotores específicos, ha permitido dilucidar patrones de migración y neurogénesis aún desconocidos. En el año 2008, Meletis, estableció líneas celulares de animales mutantes que expresaban la enzima Cre-

recombinasa bajo el control de los promotores de nestina y FoxJ1. La nestina se expresa preferencialmente en las células madre neurales y progenitores, mientras que el FoxJ1 es característico de las células ciliadas (ependimales). La administración de tamoxifen a los ratones R26R o Z/EG permitió la activación de Cre a través de la expresión de la β -galactosidasa (β gal; R26R) (Figura 2) o GFP (Z/EG).

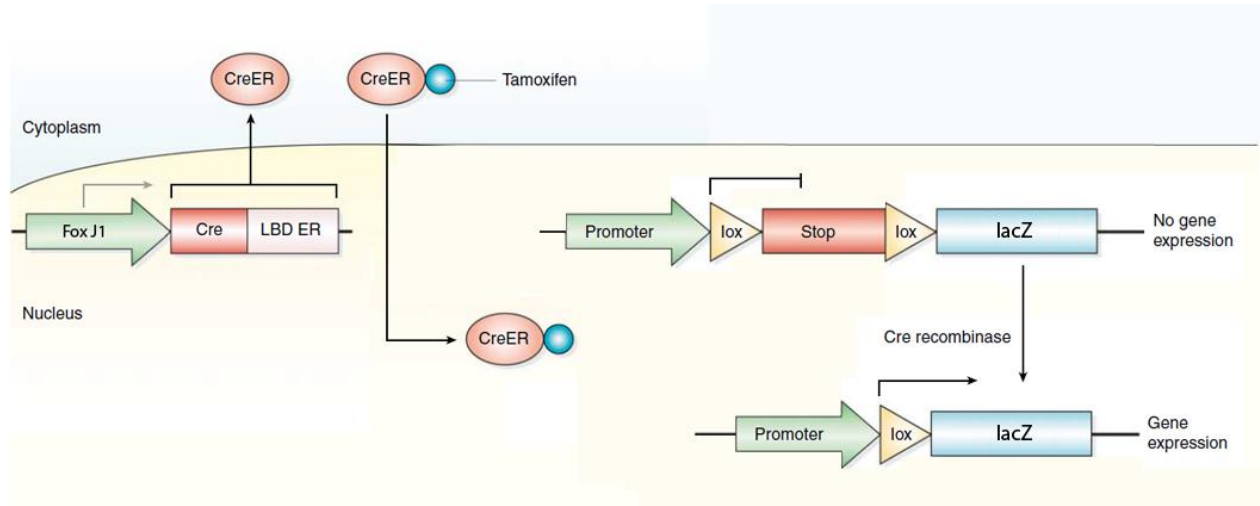


Figura 2. Activación génica mediada por Cre-RE (Kohan y col., 2010). Las células ependimales, con su promotor FoxJ1 expresan Cre; la aplicación de tamoxifen permite el desplazamiento de dicha enzima hacia el núcleo donde recombinaba con uno de los sitios loxP del gen R26R, escindiendo el codón de parada, y permitiendo la expresión del gen lacZ (codificante para β -galactosidasa).

Una vez identificada la capa ependimal mediante la expresión de β gal por las células con los promotores activados de FoxJ1 fue posible dilucidar otros marcadores de proliferación que caracterizan a estas células; Meletis y colaboradores (2008) describió que las células ependimales presentaban reactividad con vimentina, CD133/prominina-1, musashi1, Sox2, Sox3 y Sox9 (Tabla 1, Tabla 2), siendo negativo este grupo celular para Olig2. La presencia de estas proteínas está restringida al canal central, concluyéndose que las células ependimales son las únicas que muestran características NSC en médula espinal.

Las investigaciones de Johansson (1999), Horner (2000) y Meletis (2008) y colaboradores establecieron la presencia de progenitores astrocíticos y

oligodendrocíticos a nivel medular; en orden de reconocer el recambio celular de cada uno de estos tipos celulares, Barnabé-Heider y colaboradores (2010) utilizaron ratones cuya expresión de Cre estaba controlada por los promotores FoxJ1, conexina 30 (específico para astrocitos) y Olig2 (células del linaje de oligodendrocitos). El número y fenotipo de las células recombinantes fue analizado 5 días y 4 meses después de la inducción con tamoxifen, demostrándose que el número total de células recombinantes no varió en las líneas celulares ependimales y astrocíticas a lo largo del tiempo. En contraste, las células Olig2-CreER recombinantes mostraron un incremento a los 4 meses posterior a la administración de tamoxifen, observándose un crecimiento en el número de oligodendrocitos maduros (APC⁺) y un mantenimiento de la tasa en los progenitores (NG2); Barnabé-Heider y colaboradores concluyeron que los progenitores de oligodendrocitos se autorrenuevan y producen nuevos oligos maduros (Figura 1).

Desde este punto de vista una exploración de la proliferación y migración de los progenitores medulares nestina o Musashi-1 positivos después de un marcaje extensivo permitió determinar la contribución relativa de los progenitores neurales a la citoarquitectura de la médula en condiciones normales y post-lesión.

2.2 La neurogénesis en la médula espinal lesionada

En 2008, Meletis analizó la respuesta de las células ependimales a una lesión de médula espinal aplicando dosis de tamoxifen previas a la *incisión del funículo dorsal* en los ratones FoxJ1-CreER y Nestin-CreER, detectando los cambios en la proliferación y migración de las células ependimales a través de la expresión de β -galactosidasa (Figura 3).

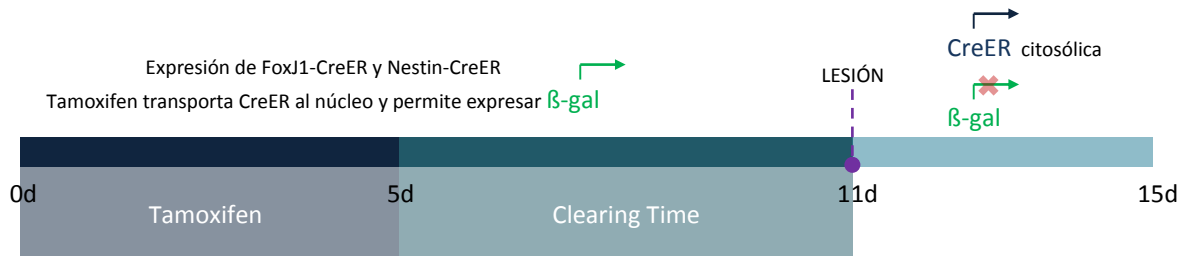


Figura 3. Paradigma de marcaje endodimensional (Meletis, 2008). Administración de Tamoxifen durante 5 días *in vivo*. En este periodo, las células con promotores FoxJ1 y Nestina (ependimales) expresan la enzima CreER produciendo la recombinación y la expresión de β-galactosidasa. La vida media del tamoxifen es de 6-12h en ratones (Robinson y col., 1991), desapareciendo de los núcleos celulares luego de 6 días (Clearing Time). Así, células que producen nestina post-lesión (astrocitos reactivos), poseen la capacidad de producir CreER citosólico, pero no de transportarlo al núcleo, siendo incapaces de expresar β-galactosidasa.

Meletis (2008) encontró que las células recombinantes migraban y se localizaban fuera de la capa endodimensional después de 4 días de haber sido efectuada la lesión; estas células, a medida que se alejaban del canal central, perdían la inmunoreactividad de los marcadores de células madre Sox2, Sox3 y la expresión del promotor FoxJ1, expresando algunas de ellas marcadores propios de oligodendrocitos (Olig2) en la zona de la lesión. Meletis y su equipo concluyeron que la proliferación de las células endodimensionales aumenta dramáticamente luego de una lesión medular, diferenciándose a oligodendrocitos y astrocitos (más abundantes) que migran al sitio de daño y conforman una cicatriz glial. En adición a las células endodimensionales existen otros progenitores neurales que residen en la materia blanca y gris en la médula espinal, los cuales expresan los marcadores NG2, Olig2 y Nkx.2.2 (Tabla 3). El aporte de estos progenitores en la neurogénesis fue estudiado por Barnabén-Heider y colaboradores utilizando los promotores FoxJ1, Connexina 30 y Olig2. Este estudio demostró que existe un aumento en el número total de células recombinantes en el sitio de lesión en comparación de las áreas adyacentes (sin daño) en las tres líneas transgénicas.

POBLACIÓN CELULAR	MARCADORES	PROMOTORES
CELULAS EPENDIMALES	Sox9, Vimentina, Nestina, CD133/prominina-1, Musashi1, Sox2, Sox3	FoxJ1
ASTROCITOS	Sox9, GFAP, S100 β	Conexina 30
Materia Blanca	Sox9, GFAP ⁺⁺⁺ , Olig2 ⁻	
Materia Gris	Sox9, GFAP ⁺⁺⁺ , Olig2 ⁻	
	Sox9, GFAP ⁺ , Olig2 ⁺	
PROG. OLIGODENDROCITOS	NG2	Olig2
LINAJE OLIGODENDROCITOS	Sox10, NG2, PDGFR α	

Tabla 3. Marcadores y promotores de cada una de las poblaciones de proliferadores celulares (Barnab  n-Heider y col., 2010). Cerca del 80% de las células endimales son reactivas para los marcadores Sox9 y vimentina. Las células astrocíticas recombinantes (conexina 30) expresan en su totalidad Sox9, así como GFAP. Los progenitores oligodendrocíticos y los oligodendrocitos maduros son positivos para Olig2, y se distribuyen en la materia blanca y gris.

La progenie de los progenitores de astrocitos (Cx30-CreER) se concentraba en el área lesionada bordeando la lesión, siendo complementaria con las células derivadas de la progenie endimal (FoxJ1) (Meletis, 2008). Todas estos grupos de células resultaban positivas para BrdU; así, Barnab  n-Heider y colaboradores pudieron concluir que existe un incremento de la proliferación post-lesión en progenitores endimales y astrocíticos, conllevando a la formación de nuevas células de sus mismos tipos celulares.

2.3 Las células madre neurales de médula espinal en cultivos *in vitro*

Reynolds y Weiss (1992) observaron el efecto inductor del factor de crecimiento epidermal (EGF) en la proliferación de células madre multipotentes y autorenovables aisladas de la capa subependimal del cerebro anterior adulto. En 1997, Palmer, demostró que el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) podía inducir la proliferación *in vitro* de progenitores neuronales y gliales obtenidos del hipocampo

adulto. Weiss (1996) experimentó con cultivos tisulares provenientes de médula espinal, los cuales en presencia conjunta de EGF y bFGF permitían el desarrollo y formación de neuroesferas. Estos ensayos fueron la base experimental que permitió establecer y mantener progenitores neurales *in vitro*; así, se podía comprobar la presencia de progenitores en regiones específicas del SNC si se generaban estos agregados celulares.

En 2008 Meletis demostró que casi todas las neuroesferas cultivadas a partir de tejido espinal expresaban CreER y eran recombinantes del gen FoxJ1, concluyendo que casi todo el potencial generador de neuroesferas reside en las células endodimales. La diferenciación de los cultivos se llevó a cabo retirando el factor de crecimiento (EGF y bFGF), logrando visualizarse neuronas (marcador β -tubulina/Tuj1), astrocitos (GFAP) y oligodendrocitos (O4); esto permitió establecer la capacidad multipotente de las células endodimales *in vitro*.

Puesto que se ha reportado un incremento de células madre neurales en la médula lesionada (Moreno-Manzano y col., 2009; Xu y col., 2006), Barnabé-Heider y colaboradores procedieron a analizar la generación de neuroesferas a partir de tejido afectado, logrando la formación de las colonias 3 a 4 veces más rápido a comparación de los cultivos derivados de la médula intacta. Estas neuroesferas, al igual que las obtenidas por Meletis, mostraban auto-regeneración y capacidad de diferenciación a astrocitos, oligodendrocitos y neuronas en cada uno de sus pasajes. Para determinar el tipo celular que induce la formación de neuroesferas bajo efecto de la lesión, Barnabé-Heider y colaboradores establecieron cultivos utilizando ratones transgénicos de cepas FoxJ1- CreER, Cx30-CreER y Olig2-CreER; el 80% de las

neuroesferas derivadas de FoxJ1-CreER recombinaron, en cultivos provenientes de animales lesionados e intactos, confirmando que la mayoría de las neuroesferas son generadas por las células endodermales para ambas condiciones.

Las lesiones efectuadas en los experimentos de Meletis (2008) y Barnabé-Heider y colaboradores (2010) fueron realizadas a nivel de la zona torácica, y su efecto estudiado *in situ*. Se presenta la posibilidad de que el daño pueda afectar la proliferación en otras zonas de la médula espinal. Estudiar a futuro el alcance de los procesos de difusión molecular de la lesión en tejido vivo y su efecto en otras áreas puede ser útil para la dosificación farmacológica (medicina experimental), así como para descubrir y definir que moléculas o gradientes moleculares producidos en la lesión pueden afectar la proliferación/diferenciación y como se co-relacionan con ella.

Por otro lado, las lesiones medulares efectuadas en estos experimentos han sido realizadas mediante laceraciones funiculares en el tejido espinal: estos modelos presentan muy baja ocurrencia clínica, por lo cual se requiere la utilización de una metodología que produzca lesiones más ajustadas a la realidad etiológica. La compresión medular permite establecer lesiones severas y de carácter crónico, pudiendo evaluarse la respuesta celular y proliferativa a lo largo del tiempo en distintas etapas de la condición, logrando adecuar y seleccionar de manera más específica los tratamientos requeridos para una rápida recuperación en el paciente.

3. OBJETIVOS

Objetivo General:

Estudiar el proceso de neurogénesis en la médula espinal intacta y a consecuencia de una lesión mecánica inducida por compresión lateral

Objetivos Específicos

- Establecer el curso temporal del síndrome parapléjico inducido por el trauma de la médula espinal generado por la compresión medular al nivel de la vértebra torácica 9 (T9).
- Determinar la proliferación celular mediante la administración de BrdU en las regiones cervical y torácica de la médula espinal en animales intactos no sometidos a cirugía comprimidos lateralmente (lesionados) en T9.
- Cuantificar los subtipos celulares: progenitores neurales, astrocitos y oligodendrocitos y su localización anatómica en animales intactos y lesionados en la vértebra T-9 de la médula espinal por compresión lateral.
- Determinar la migración celular in vivo de progenitores espinales mediante la determinación de las células marcadas mediante BrdU en animales intactos, no lesionados y lesionados.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones machos de la cepa C57/BL6 de 5 semanas de edad, con un peso entre 20 a 25 gramos, suministrados por el Bioterio Central del IVIC. Los ratones tuvieron acceso libre a agua y alimento, siendo mantenidos en las condiciones apropiadas de temperatura y luz de acuerdo a los criterios bioéticos establecidos a nivel institucional.

4.2 Inducción de lesión de la médula espinal en T9

El protocolo aplicado para la compresión medular se basó en las experiencias previas de Plemel y colaboradores (2008), modificándose levemente durante el proceso de aprendizaje y estandarización de la operación.

Todas las cirugías se efectuaron en condiciones asépticas bajo una campana de flujo laminar. El espacio de trabajo fue desinfectado con cloro y alcohol al 70%. El material quirúrgico se esterilizó previo a la cirugía.

La cirugía se practica en los animales previamente anestesiados con una solución que ketamina/xilacina (75mg/kg-7,5mg/kg preparada en solución salina he inyectada intraperitonealmente); una vez sedados se afeita la zona dorsal y se desinfecta con alcohol al 70% y yodopovidina (Betadine ©). El animal se colocó en un aparato estereotáxico, donde fue retenido para evitar cualquier movimiento o reflejo durante la operación. Se requirió la aplicación de un gel ocular (GenTeal ©) a objeto de impedir la desecación en los ojos del animal (Figura 4A).

Se realizó un corte a nivel de las vértebras T5 a T12 (Figura 4B), separando con una tijera piel de fascia. Con un bisturí se cortó, paralelo a las apófisis vertebrales, la unión de los músculos dorsales con las vértebras (Figura 4C). La formación de este “canal” permitió la separación de los músculos dorsales mediante la introducción de una pinza Rongeur; utilizando esta misma herramienta se escinden los tendones que unen músculos y columna, logrando la separación de 3 vertebras alrededor de T9. Con ayuda de un buril se retiran los restos de tejido adheridos a las vértebras, hasta ser apreciable el espacio inter-vertebral existente entre cada una de las vértebras (Figura 4D). Introduciendo la pinza Rongeur en la apófisis lateral, de forma paralela al eje de la médula, se realiza el corte de la vértebra T9; este proceso se repite a ambos lados, logrando la separación de la lámina superior de la vértebra (laminectomía) y la exposición medular (Figura 4E).

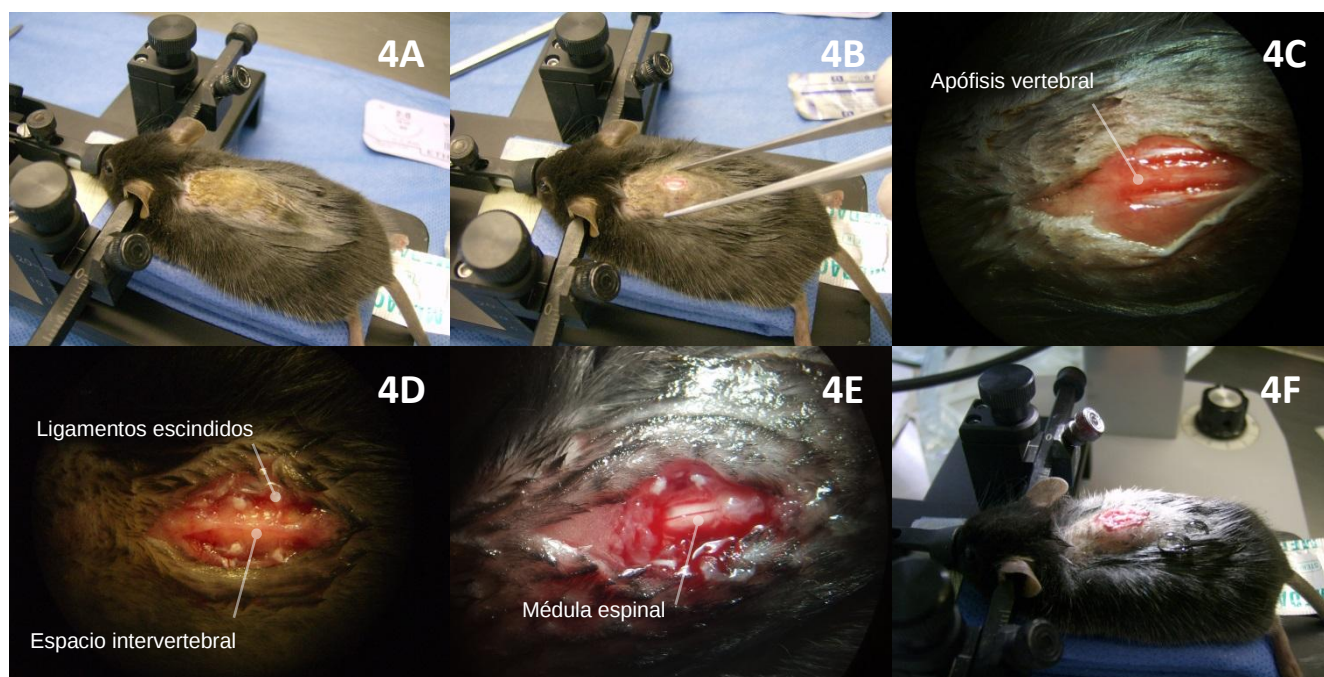


Figura 4. Laminectomía de la vértebra T9: a) Ubicación y preparación del animal; b) Corte de la piel a nivel de las vértebras T9-T12; c) Corte de los músculos dorsales insertados en la columna vertebral; d) Separación de los músculos dorsales, corte de ligamentos, limpieza y exposición de la columna vertebral; e) Laminectomía y exposición de la médula espinal; f) Sutura del animal.

Se procedió a la compresión de la médula con una pinza fórceps de modificada para realizar un cierre dejando una apertura de 0,16mm, cuidando de no lacerar la médula al introducir la herramienta dentro de la ventana vertebral. La compresión se mantuvo durante 30s. Una vez lesionada la médula se suturaron los músculos dorsales y la fascia con ayuda de un hilo crómico (Catgut ©); la incisión de la piel se cerró mediante el uso de grapas. Los animales operados-no lesionados fueron sometidos al proceso de laminectomía más no a la compresión de la médula espinal. Los cuidados postoperatorios consistieron en la administración diaria de dipirone (0,5mg/kg preparada en solución salina por vía subcutánea) como analgésico durante tres días post-cirugía. Durante este mismo periodo de tiempo también se administró Enrofloxacin (5mg/kg Bayer ©, sc), para prevenir cualquier infección derivada de la operación. Una vez lesionados los animales pierden su reflejo de micción y defecación por lo cual fueron efectuados masajes abdominales diarios postoperatorios.

A todos los animales intactos, no lesionados y lesionados se les realizó una prueba de campo abierto durante los días 1,2,3,5,7,10 y 14 post operación. En ella los ratones seleccionados al azar se ubicaban en un espacio confinado de 40x40cm remarcado con recuadros de 10x10cm. Durante 3 minutos se evaluaba la actividad postural y se clasificaba mediante la escala de Basso la capacidad motora del ratón. Esta escala consiste en la valoración relativa del 0 al 9; cero es la mínima calificación e indica disfunción absoluta de los miembros traseros mientras que nueve indica una pisada plantar y coordinación motora normal en el movimiento de ambas patas. Cada uno de los puntajes, y sus definiciones operacionales, se definen con más detalle en la sección de *Anexos: Escala de Basso*.

4.3 Determinación de la proliferación celular de la médula espinal de animales intactos

Tomando el esquema experimental de Horner y colaboradores (2000), un total de n=6 ratones fueron sometidos a inyecciones diarias de BrdU (50 mg/kg p.i) durante 14 días. El BrdU, nucleótido análogo de la timidina, es incorporado al DNA de las células en división durante la fase S, lo que permite la determinación de progenitores en la médula espinal mediante inmunohistoquímica con anticuerpos α -BrdU. La coexpresión de BrdU y otros marcadores permite establecer el fenotipo de las células que se encuentran en proliferación.

Los animales fueron sacrificados a los 1 (n=3) y 7 (n=3) días después de la última administración de BrdU (ver esquema de tratamiento en la Figura 5); esto permitió cuantificar la proliferación celular en estos dos tiempos de interés.

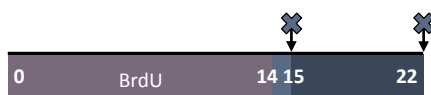


Figura 5. Determinación de la proliferación celular en la médula espinal.

4.4 Determinación de la proliferación celular en la médula espinal lesionada por compresión

Un total de n=13 ratones (4 no lesionados y 9 lesionados) fueron operados según el protocolo descrito anteriormente (Sección 4.2) y sometidos a inyecciones intraperitoneales diarias post-operatorias de BrdU (50mg/kg en solución salina) durante 14 días. Los animales fueron sacrificados a los días 1 y 7 después de la última inyección de BrdU.

La administración del marcador de proliferación BrdU posterior a la lesión permitió cuantificar el efecto de la lesión sobre la proliferación de progenitores en la médula espinal (Figura 6).

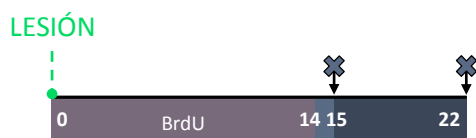


Figura 6. Esquema de administración de BrdU para la determinación de la proliferación celular en la médula espinal en animales lesionados.

4.5 Fijación de tejido medular por perfusión intracardial

Basado en los protocolos de inmunohistoquímica desarrollados por Cote y colaboradores (1994) pertinentes a la preservación del tejido, se procedió a la perfusión del animal.

Los animales fueron colocados bajo anestesia profunda utilizando una mezcla de ketamina/xilacina (75:7.5 mg/kg, i.p.). Una vez completamente anestesiados, y con ayuda de una tijera quirúrgica, se realizó una incisión desde el abdomen hasta el torax; expuesta la caja torácica, se cortaron las costillas y el diafragma, logrando visualizar el corazón.

Se procedió a introducir una cánula en el ventrículo izquierdo cortando inmediatamente la aurícula derecha; esta cánula conforma la vía transcardial que conectada a una bomba peristáltica permitió la infusión de buffer fosfato (PB 0.1M) a 8 ml/min por 7min, esto a objeto de desangrar el animal. Transcurrido el tiempo se infundió p-formaldehído (PFA) al 4% en PB 0.1M pH 7.4 por 7 min como agente fijador.

La médula espinal es extraída mediante una disección que consiste en la decapitación del animal y corte de todas las vértebras de la columna.

La médula espinal es colocada en PFA al 4% durante 48 horas a 4°C. El tejido es luego transferido a una solución de sacarosa al 30% en buffer fosfato 0.1 M y almacenado a 4°C; una vez decantado es posible la obtención de las secciones para el análisis por inmunohistoquímica.

4.6 Obtención de secciones transversales de la médula espinal

A partir de la médula espinal entera se obtuvieron las secciones completas de las distintas regiones de la médula (cervical y torácica); estas secciones son llevadas a un micrótopo de desplazamiento lateral Leica SM2010R, donde son embebidas en una matriz de congelación y solidificadas mediante la aplicación de hielo seco y acetona. El espesor de cada corte es de 25µm. Los cortes, obtenidos de manera seriada, fueron colocados en placas de Elisa con solución de criopreservación (etilenglicol 25%, buffer fosfato 50%, sacarosa 25%) y mantenidos a -20°C.

4.7 Determinación de las células en proliferación y su fenotipo mediante técnicas de inmunohistoquímica

4.7.1 Estimación de las células en proliferación

Para establecer las células en proliferación se determinó la incorporación de BrdU haciendo uso de un anticuerpo RAT anti-BrdU 1/300 (SEROTEC ©), tanto en los cortes de la médula de animales intactos (n=6) como en aquellos provenientes de la médula lesionada por compresión (n=6).

Además, se efectuaron inmunomarcajes con el anticuerpo KI67 1/200 (Milipore ©) en secciones de médula espinal de animales no lesionados (n=4), así como a otro grupo al que también se le hizo la compresión (n=3).

La molécula KI67 es un marcador de proliferación celular que esta presente en casi todas las fases del ciclo celular (G_1 , S, G_2 y mitosis) con excepción de la fase G_0 , mientras que el marcaje de BrdU esta reducido a la fase S del ciclo celular. La utilización de ambos marcadores en paralelo permitió confirmar la cuantificación y ubicación de las células que se encuentran en proliferación.

Siguiendo los protocolos desarrollados en el Laboratorio de Patología Celular y Molecular (IVIC), el proceso de marcación comenzó con lavados sucesivos en PBS (3x10min) para eliminar los residuos de la solución de criopreservación; prosiguió con la aplicación de Peróxido de Hidrógeno 3% en metanol 100% durante 15min, a objeto de eliminar peroxidasas endógenas que pudieran causar falsos positivos.

Se realizaron lavados con agua destilada (10min) y PBS (3x10min) para incubar con HCl 2N a 37°C (30min); el ácido es requerido en la desnaturalización del DNA, logrando exponer el BrdU incorporado. El HCl es neutralizado con la incubación de Buffer Borato 0.1M pH 8.5 por 10min seguido con 3 lavados de PBS (3X10min).

Las secciones son luego incubadas con Triton X-100 (0,2% en PBS) por 30min. El Triton X-100 es un detergente que permeabiliza las membranas y permite, por lo tanto, el ingreso de los anticuerpos al citosol y núcleo de las células.

Después de la permeabilización el tejido se lava con 3 cambios de PBS (10min c/u), seguido por la incubación con una solución de bloqueo de sitios inespecíficos que consiste en 1% albumina sérica de bovino y 4% Normal Goat Serum en PBS durante 90min.

Las secciones se incuban con el anticuerpo primario en solución de bloqueo durante 48 horas a 4°C. Transcurrido el tiempo, los cortes se lavan en Tween 0.2% en PBS 3x20min.

Seguido a esto se incubaron en oscuridad los cortes de médula en anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos (1:200 en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las combinaciones utilizadas se especifican en la siguiente sub-sección. Finalmente, se realizaron lavados sucesivos con PBS.

Con ayuda de un pincel se montaron los cortes en láminas portaobjetos recubiertas con Vectashield (Vectorlabs ©). Estos dos compuestos tienen como objeto la protección del fluoróforo conjugado al anticuerpo secundario.

Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio Zeiss AXIOVERT A1 con capacidad para fluorescencia;

4.7.2 Caracterización fenotípica de las células en proliferación

La identificación de las células en proliferación (positivas para BrdU) se llevó a cabo mediante la coexpresión con marcadores específicos; así la detección de astrocitos se realizó con el anticuerpo GFAP 1/500 (Serotec, USA), NG2 1/200(Millipore, USA) para el reconocimiento de progenitores de oligodendrocitos y finalmente Nestina 1/200 (RD) para comprobar células endoteliales en proliferación.

ASTROCITOS EN PROLIFERACIÓN

- Rabbit Anti **GFAP** – Donkey Anti Goat Alexa **488**
- Rat Anti **BrdU** – Donkey Anti Mouse Dylight **594**

EPENDIMALES EN PROLIFERACIÓN

- Mouse Anti **Nestin** – Goat Anti Rat Alexa **488**
- Rat Anti **BrdU** – Donkey Anti Mouse Dylight **594**

OLIGODENDROCITOS EN PROLIFERACIÓN

- Rabbit Anti **NG2** – Goat Anti Rabbit Alexa **488**
- Rat Anti **BrdU** – Donkey Anti Mouse Dylight **594**

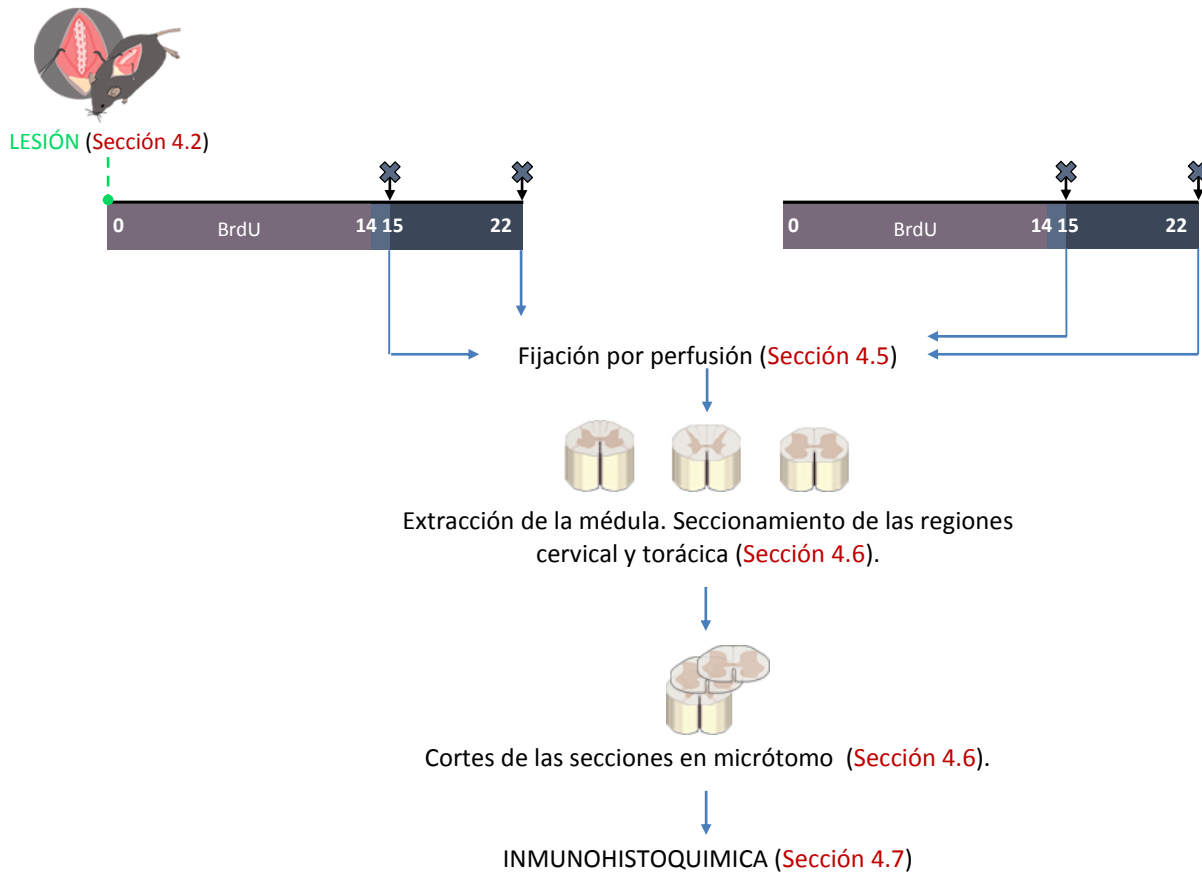


Figura 7. Protocolo general para la obtención de cortes e inmunohistoquímica.

4.8 Procesamiento de las imágenes

Realizada la inmunohistoquímica se procedió a la obtención de las imágenes por fluorescencia utilizando un microscopio Zeiss AXIOVERT A1. Se requirió el montaje del conjunto de fotos en pro de obtener una composición de toda la médula a 100X de definición; para ello se utilizó el programa AdobePhotoshopCS3© haciendo coincidir puntos de referencia comunes para generar una toma continua (Figura 8A). Realizado

el montaje de la médula se estableció un cuadrado digital de $100\mu\text{m}^2$ utilizando como referencia una foto de calibración tomada a la misma magnitud que las fotos de las secciones; este cuadrado a su vez poseía valores en número de píxeles (Figura 8B).

Con esta misma técnica se establecía una superficie digital sobre la materia gris (o blanca) de la médula espinal; esta superficie también podía ser cuantificada en número de píxeles (Figura 8C). Por último, se realizaba la conversión de esta cantidad de píxeles contenidos en materia blanca y gris a micrómetros cuadrados (Figura 8D)..

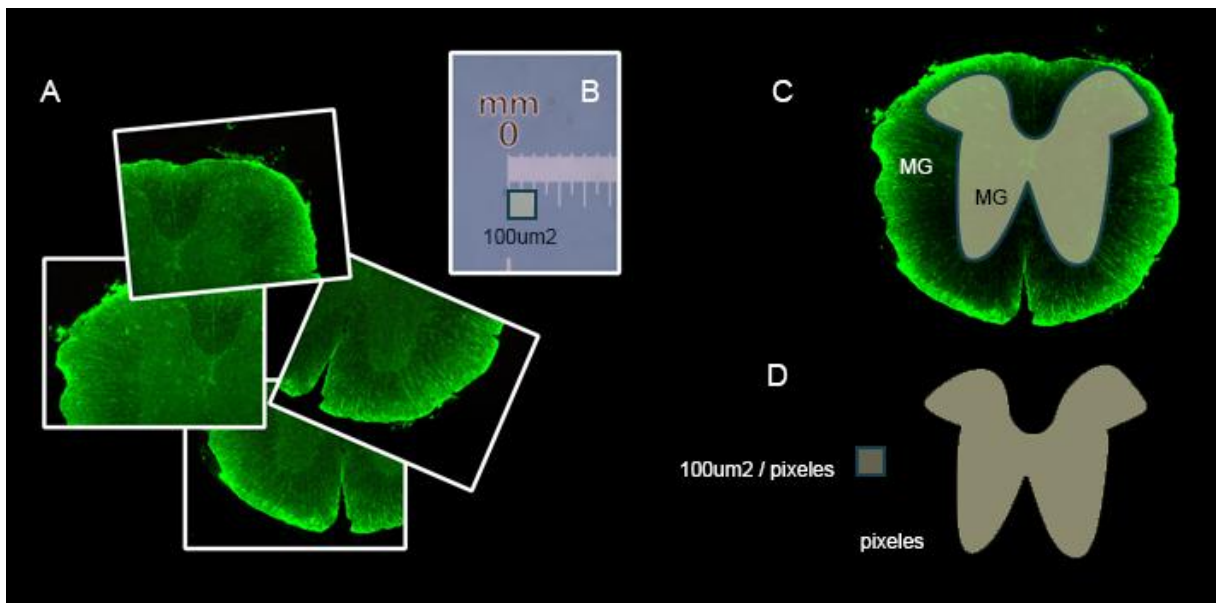


Figura 8. Procedimiento para composición de imágenes: A) Se hacen coincidir puntos de referencia comunes en las distintas imágenes para realizar una panorámica. B) Foto de calibración. C) Superficie de materia gris generada digitalmente. D) Relación en píxeles entre el área calibrada y el área generada a partir de la delimitación de la MB/MG

4.9 Análisis de las imágenes.

Una vez realizado los montajes de las imágenes se procedió a la cuantificación de las células BrdU⁺ en cada médula mediante el uso del software ImageJ ©. Utilizando la herramienta "Cell counter" se ubicaban puntos de referencia en cada una de las células en proliferación estableciendo un "mapa de marcaje"; este mapa se guardaba y se abría sobre la imagen del fenotipo correspondiente a la

inmunohistoquímica de BrdU (doble marcaje). Así, si los puntos del mapa coincidían, eran cuantificados como fenotipos en proliferación.

Se estudiaron 4 secciones (separadas $200\mu\text{m}$) para la región cervical y torácica de cada individuo-médula (representando una distancia intramedular de muestra de aproximadamente $600\mu\text{m}$).

Finalmente, los datos se organizaron para realizar un análisis estadístico organizado por tratamiento (intacto, no lesionado, lesionado), tiempo (día 1 vs día 7) y región cervical vs torácica. Los resultados se analizaron usando un análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa Graph Pad Prims © como estadístico de prueba y su aplicación se referencia en la sección de *Resultados*.

5. RESULTADOS

5.1 Evaluación conductual de animales lesionados por compresión medular.

Una vez practicada la cirugía, los animales no lesionados y lesionados presentan una parálisis del cuarto posterior que corresponde al valor mínimo según el índice de Basso. El valor del índice permanece en este nivel y se recupera paulatinamente hasta alcanzar su valor máximo al día 7 post lesión en los ratones no lesionados (Figura 9).

Al mismo tiempo se determinó la actividad locomotora espontanea en una prueba de campo abierto mediante el conteo del número de cuadrados cruzados por los ratones en un periodo de tres minutos.

A partir del día 7 se determinó una diferencia significativa en la evolución y capacidad motora entre los ratones no lesionados y lesionados ($F(1,2) = 8.99$, $P > 0.05$), lo que sugiere un progreso en la recuperación de la función motriz.

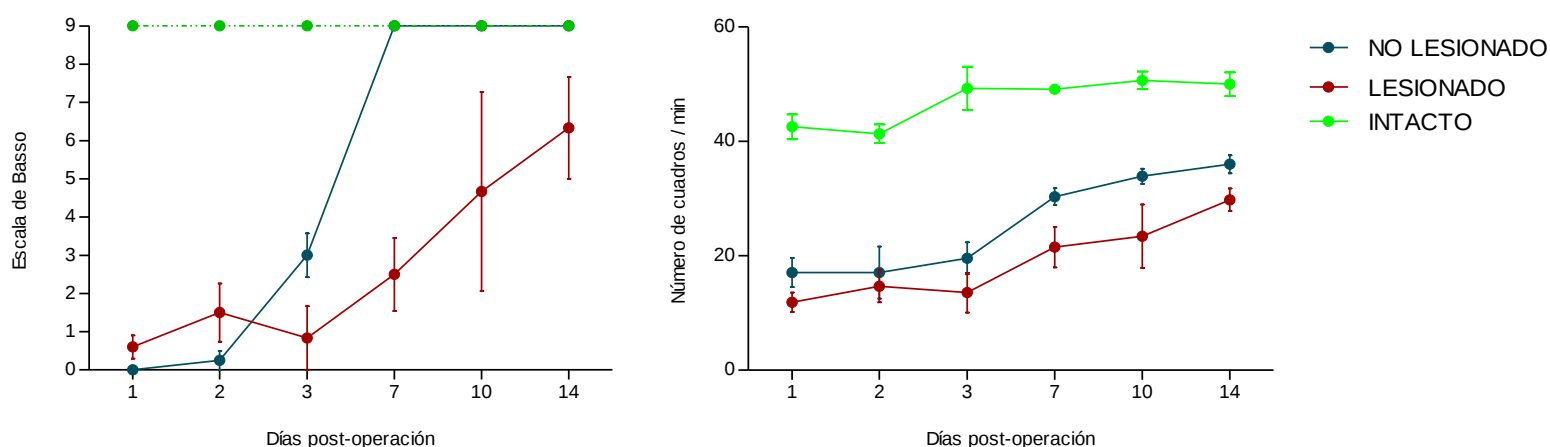


Figura 9. Análisis de conducta: (A) Índice de Basso respecto al tiempo. (B) Muestra el número de cuadrados de 10x10cm recorridos por el ratón durante un minuto. En ambos casos se evaluó el tiempo como variable independiente durante catorce días post operación (Eje X). Se muestra en azul la evolución de los animales no lesionados, en rojo el de los ratones lesionados por compresión lateral y en verde los ratones intactos. Cada valor es la media $\pm$ el SEM de por lo menos $n=3$ animales intactos, $n=6$ no lesionados y $n=3$ lesionados.

5.2 Determinación de la proliferación celular en la médula espinal intacta

Se seleccionaron las regiones cervical y torácica para establecer el número de células inmunomarcadas con el anticuerpo anti-BrdU.

En promedio se cuantificaron 100 ± 32 y 79 ± 24 (media $\pm$ SEM) células BrdU⁺ en las muestras de secciones transversales de la región cervical y torácica respectivamente.

Como estrategia para entender la distribución de las células en proliferación celular se generaron áreas digitales utilizando la diferencia morfológica de la sustancia blanca y gris en la médula espinal.

Las variables a estudiar consistían en valores de densidad celular (células BrdU⁺/mm²), todos ellos realizados en un periodo de siete días de diferencia (15d.p.o y 21d.p.o). Así, si existían diferencias en la proliferación para ambas condiciones temporales en algunas de las regiones anteriormente descritas, se podría inferir algún proceso de migración/proliferación en la médula espinal.

Puesto que los análisis preliminares utilizando el número de células pudieron estar sobreestimados por el área de observación, se consideró primordial la inclusión del factor de corrección generado por las superficies de cada una de las regiones de la médula espinal. Con ello, todos los análisis presentados en este estudio han sido realizados utilizando las densidades celulares de la sustancia blanca y gris, permitiendo considerar las características morfológicas propias de la médula espinal.

5.2.1 Análisis de la densidad celular en MB y MG (D1)

La médula espinal se encuentra anatómica y fisiológicamente dividida en dos regiones importantes: una **zona mielinizada** o de materia blanca (MB) y una **zona desmielinizada** o de materia gris (MG). Si el estudio se realiza tomando en cuenta el área que circunscribe cada región, se logra la determinación de densidades de 21.9 ± 9.1 células BrdU/mm² y 73.6 ± 22.1 células BrdU/mm² en MG y MB de la región cervical.

En el caso de la región torácica se determinaron densidades de 27.5 ± 3.0 células BrdU/mm² en MG, mientras que 160.7 ± 41.4 corresponde a la MB (Figura 10). Así, los análisis de las densidades sugieren que existen diferencia entre las MG y MB de las regiones cervical ($[F(1,2) = 21.59, P < 0.05]$ y torácica $[F(1,2) = 8.63, P < 0.05]$ por separado.

Esta diferencia entre la neurogénesis de ambas regiones es visible cuando el número total de células en proliferación en MG representa el 21.8% de todas las células BrdU⁺ presentes en la médula, mientras que la MB comprende el 78.1% de todas las células BrdU⁺ (Figura 10B). Estos mismos valores porcentuales son similares para la zona torácica.

5.2.2 Análisis de densidad celular en MB y MG (D7)

Para el día 7 p.i., en la región cervical, se determinaron densidades de 21.7 ± 9.0 y 60.6 ± 24.8 células BrdU/mm² en las MB y MG respectivamente; mientras que para la región torácica se registran valores de 47.2 ± 8.0 y 67.0 ± 16.5 células BrdU/mm² en MG y MB.

La comparación de las densidades celulares de ambas regiones de la médula permiten concluir que existe una diferencia entre en las poblaciones de MB y MG tanto en la región cervical [$F(1,2) = 8.28$, $P < 0.05$] como en la torácica [$F(1,2) = 7.79$, $P < 0.05$], pero no entre las regiones respectivas de la zona cervical y torácica.

La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos en la cuantificación de las células en proliferación. Las columnas de BrdU densidad indican las células BrdU/mm² para cada una de las regiones; un segundo grupo, denotado como BrdU%, indica el porcentaje que representa las células BrdU⁺ encontradas en cada área respecto al número total de células BrdU cuantificadas en toda la médula. Debido a la importancia de la capa endotelial en la respuesta a la lesión se incluye dicha región en la tabla. La ausencia de las densidades específicas para dicha zona es debido a la dificultad para definir el área de la capa endotelial.



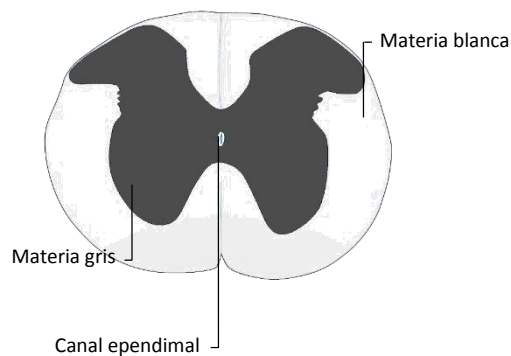
CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS BrdU EN DISTINTAS REGIONES DE LA MÉDULA ESPINAL INTACTA

	CERVICAL				TORÁCICO			
	BrdU DENSIDAD		BrdU %		BrdU DENSIDAD		BrdU %	
	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7
Ependimal			1%	3,5%			2%	4,1%
MG	21.9 ± 9.1	21.7 ± 9.0	21.8%	25.0%	27.5 ± 3.0	47.2 ± 8,0	9.8%	29,9%
MB	73,6 ± 22,1	60,6 ± 24,8	78.1%	74.8%	106.7 ± 41.4	67.0 ± 16.5	91.2%	70,0%
TOTAL	49.4 ± 15.3	42.5 ± 17.1	100,0%	100,0%	78,5 ± 24,0	62,2 ± 11,0	100,0%	100,0%

Tabla 4. La primera columna refiere a la capa endotelial, MG y MB. **BrdU DENSIDAD:** refiere a la densidad promedial (**Media ± error estándar**) de células BrdU⁺ en cada área/región **BrdU PORCENTAJE:** refiere al porcentaje que representa las células BrdU⁺ encontradas en cada área respecto al total obtenido en la cuantificación discreta. El porcentaje de células endoteliales está incluido en el conteo de la materia gris. Los valores fueron obtenidos a partir de N=3 animales

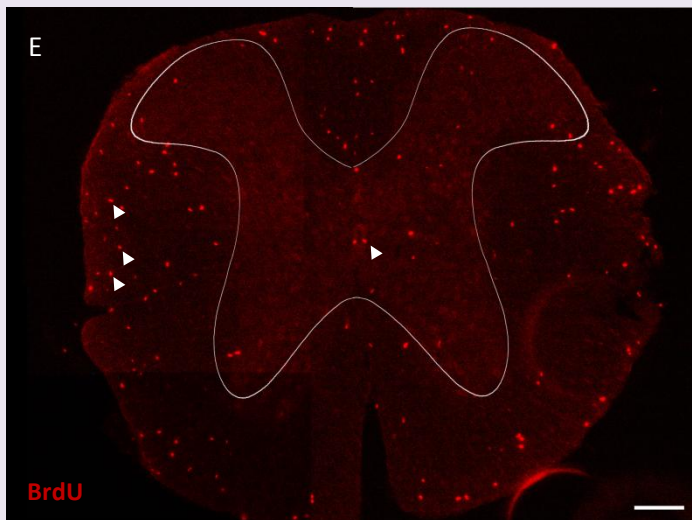
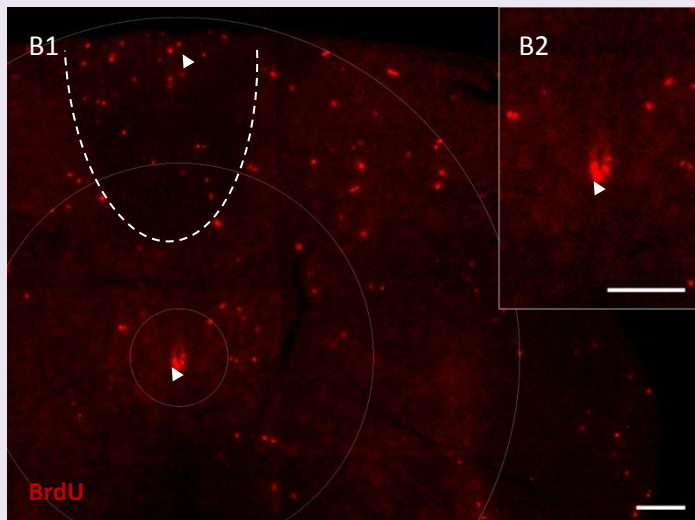
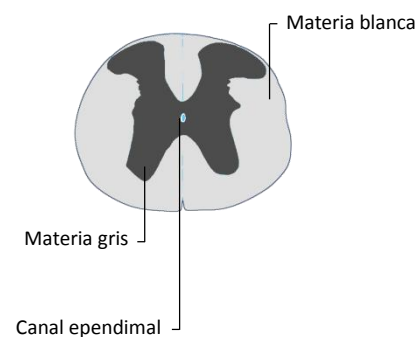
A

CERVICAL

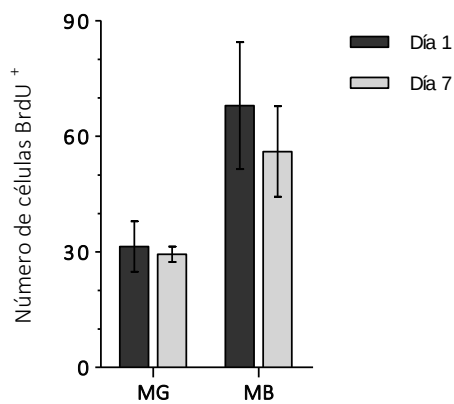


D

TORÁCICA

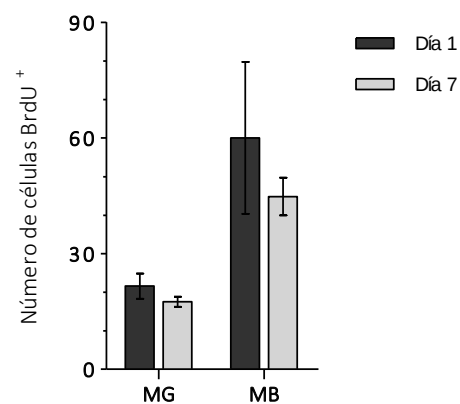


C



Región de la médula espinal

F



Región de la médula espinal

Figura 10. Determinación de la proliferación celular en las regiones cervical y torácica de la médula espinal intacta: Esquema de la MB y gris de la región cervical (A). Proliferación en las regiones de la médula cervical; se señalan células en proliferación de la capa endodistal (B1) y el funículo dorsal medular (B2). Gráfico de densidad de células BrdU⁺ en MB y MG en la región cervical (C). Esquema de MB y gris en región torácica (D). Proliferación celular en la región torácica: se muestran gran número de células BrdU en la periferia lateral y en canal central (E). Gráfico de densidad de células en proliferación en MB y MG en región torácica (F). **EJE Y Gráficos:** Número de células BrdU⁺/mm². **Barras:** 100µm. Los valores fueron obtenidos a partir de N=3 animales para cada condición.

5.3 Caracterización de progenitores en la médula espinal intacta

Todos los análisis comparativos de la proliferación y caracterización celular entre la MB y gris de las distintas regiones fueron realizados utilizando las densidades celulares.

Por cuestiones prácticas, y en pro de visualizar los aportes de cada fenotipo nervioso en el proceso proliferativo, se muestran la data obtenida como la contribución porcentual de los astrocitos, oligodendrocitos y células endodimales al total de células BrdU en la médula espinal.

5.3.1 Células endodimales

La capa endodimal ubicada en el canal central de la médula espinal muestra alta reactividad contra el anticuerpo nestina; las células aquí localizadas poseen proyecciones hacia la zona dorsal y ventral (Figura 11E) de la médula y mantienen sus somas circunscritos a dicha capa.

Para resaltar la variable en este orden temporal en día 1 se incluyó en paréntesis los resultados obtenidos en el día 7.

En el canal central, las células endodimales en proliferación (nestina⁺/BrdU⁺) representan el 0.5% (D7: 4.6%) de todas las células BrdU⁺ en la región cervical de la médula espinal.

En la MB de la región cervical las células nestina⁺/BrdU⁺ representan el 1.2% (D7: 5.4%) de todas las células BrdU⁺. Gran parte de este porcentaje es aportado por concentraciones celulares altamente reactivas a nestina que se ubican en la funículo

dorsal (Figura 11B); la morfología de estas células difiere de manera significativa de las endodimales, y su asociación a capilares sanguíneos sugiere que son células endoteliales y astrocitos reactivos. Cabe destacar que estas agrupaciones celulares nestina⁺ del funículo dorsal solo estuvieron presentes a nivel cervical. En lo que refiere a la MB, se determinaron densidades celulares de 5.1 ± 0.9 nestina-BrdU/mm², constituyendo el 6.7% (D7: 4.2%) del total de células BrdU en médula.

Respecto a la zona torácica se encontró que las células endodimales en mitosis (nestina⁺/BrdU⁺) contribuyen con el 2.9% (D7: 4.9%) de todas las células BrdU⁺ presentes en médula (Figura 11E). Se encontraron otros grupos celulares nestina⁺/BrdU⁺ en la MB y MG los cuales aportan el 2.9% (D7: 2.0%) y 2.4% (D7: 1.5%) respectivamente.

Por último, no existe diferencia significativa entre la proliferación de las células endodimales (nestina/BrdU⁺) en el día 1 con respecto al día 7, tanto para la región cervical [$F(1,2) = 1.89$, $P > 0.05$] como para la torácica [$F(1,2) = 0.34$, $P > 0.05$] (Figura 11C y 11F).

	Densidad de células nestina ⁺ /BrdU ⁺							
	CERVICAL				TORÁCICO			
	nestina ⁺ BrdU ⁺ /mm ²		Porcentaje		nestina ⁺ BrdU ⁺ /mm ²		Porcentaje	
	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7
Ependimal			0,5%	4,6%			2,9%	5,4%
MG	1.9 ± 0.1	2.4 ± 1.1	1,2%	5,4%	2.5 ± 1.2	3.3 ± 1.8	2,9%	2,0%
MB	5.1 ± 0.9	6.7 ± 0.7	6,7%	4,2%	1.9 ± 1.8	1.8 ± 0.9	2,4%	1,5%
TOTAL			7,9%	9,5%			5,3%	5,4%

Tabla 5. Densidad de células nestina⁺/BrdU⁺. La primera fila refiere a la capa endodimal, seguida por materia gris (MG) y blanca (MB). Se muestran dos columnas: una con las densidades celulares nestina⁺BrdU⁺/mm² para cada región a distintos tiempos, y otra columna que indica el porcentaje de aporte de las células nestina⁺BrdU⁺ al total de células BrdU presentes en la médula. Los valores porcentuales son extraídos a partir de los conteos celulares absolutos (no aparece). No se muestran los valores de densidad endodimal debido a la imposibilidad de definir el área de dicha capa, ni los valores de densidad total, pues supondría la homogenización morfológica y tisular de la médula.

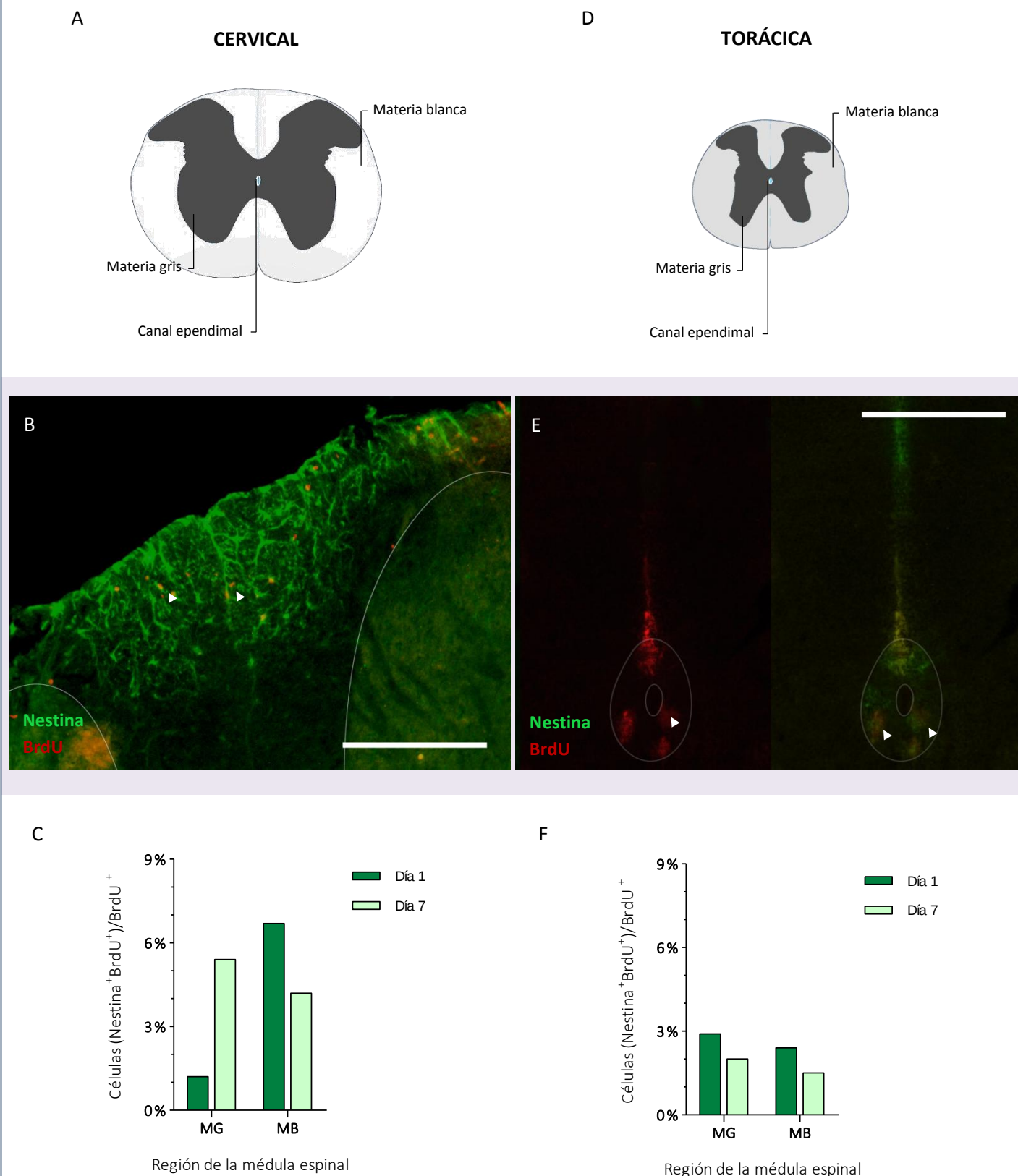


Figura 11. Determinación de células nestina en proliferación en la región cervical y torácica: Esquema de la materia blanca y gris de la región cervical (A). Distribución de células nestina⁺/BrdU⁺ en la médula espinal cervical (B). Proporción de aporte de las células nestina⁺/BrdU⁺ al total de células en proliferación en las regiones de la MG y MB (C). Esquema de materia gris y blanca en la región torácica (D). Células nestina⁺/BrdU⁺ en la capa ependimal; se muestra la coexpresión de todas las células en proliferación con el marcador nestina (E). Proporción de contribución de las células nestina⁺/BrdU⁺ en el total de células en proliferación de MB y MG de la región torácica (F). **Barras:** 100µm. N=3 animales por condición.

5.3.2 Astrocitos

Los resultados mostraron reactividad del anticuerpo GFAP en toda la médula espinal, concentrándose especialmente hacia la periferia de la misma (Figura 12A); estos cuerpos celulares se encuentran a aproximadamente 200µm del perímetro y derivan sus proyecciones hacia las zonas más externas del mismo.

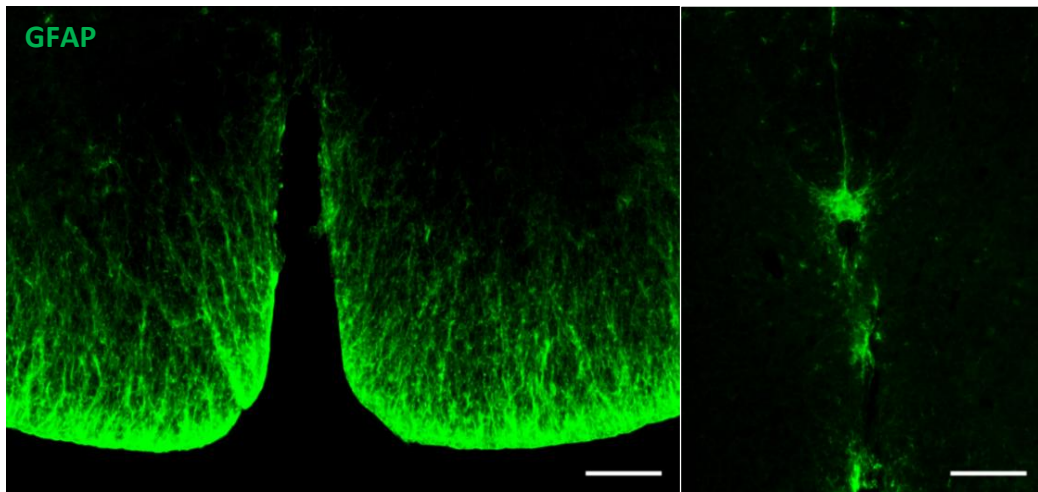


Figura 12. Determinación de astrocitos en la médula espinal. (A) Las células GFAP estuvieron distribuidas preferencialmente en la MB rodeando a la MG. (B) Astrocitos cerca del canal central: células GFAP⁺ con proyecciones dorsales. Las barras de escala representan 100µm para (A) y (B).

Cercano al canal central existen un conjunto de células GFAP⁺ ubicadas en la parte dorsal de la capa ependimal. Estas células poseen múltiples extensiones que derivan hacia el parénquima dorsal y ventral (Figura 12B); muy pocas de ellas son positivas a BrdU, siendo su aporte al total de células en proliferación de 0.5% (D7: 0%) para la región cervical. La disposición anatómica de las células GFAP⁺ parece diferir entre regiones: en MB se muestran como largas extensiones radiales que se proyectan en dirección a la periferia de la médula, mientras que en la MG, estas proyecciones se introducen en la región desmielinizada dejando solo visibles los somas de los astrocitos.

El porcentaje total de células GFAP⁺/BrdU⁺ (respecto al total de células BrdU⁺ en médula) en la MB representa el 36.5% (D7: 33.4%), mientras que la MG contiene cerca del 5.8% (D7: 7.6%) para la región cervical (Figura 13F).

Respecto a la región torácica se encontró que la MB aporta el 44.6% (D7: 42.1%), contribuyendo la MG con 4.6% (D7: 6.3%) al total de células BrdU.

Los análisis estadísticos realizados mediante valores de densidad celular (GFAP⁺/BrdU⁺/mm²) confirmaron que existen diferencias significativas en la distribución de células GFAP⁺/BrdU⁺ entre las MB y MG de la región cervical [$F(1,2) = 30.09$, $P < 0.05$] y torácica [$F(1,2) = 151.3$, $P < 0.05$] de D1 por separado (Figura 13); para el día 7 esta diferencia continua para ambas regiones (Cervical: $F(1,2) = 61.44$, $P < 0.05$, Torácico: $F(1,2) = 37.36$, $P < 0.05$).

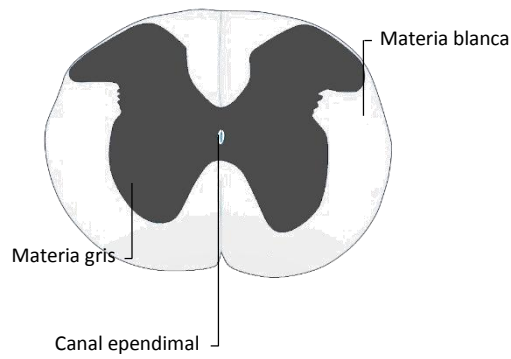
Esto permite afirmar que hay heterogeneidad de la población celular GFAP⁺/BrdU⁺ en el tiempo, evidenciándose mayor densidad hacia la MB en ambas regiones de la médula espinal. Los valores de densidad de células GFAP⁺/BrdU⁺ pueden encontrarse referidos en la Tabla 6

	Densidad de células GFAP en proliferación							
	CERVICAL				TORÁCICO			
	GFAP ⁺ BrdU ⁺ /mm ²		Porcentaje		GFAP ⁺ BrdU ⁺ /mm ²		Porcentaje	
	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7
Ependimal			0%	0%			0,1%	1,0%
MG	5.4 ± 1.3	3.6 ± 1.8	5,8%	7,6%	9.5 ± 2.3	11.5 ± 2.1	4,6%	6,3%
MB	25.1 ± 6.3	16.0 ± 2.7	36,5%	33,4%	56.7 ± 11.9	49.2 ± 9.8	44,6%	42,1%
TOTAL			42,2%	41,1%			49,1%	48,1%

Tabla 6. Densidad de células GFAP⁺/BdU⁺. La primera fila refiere a la capa ependimal, seguida por MG y MB. Se muestran dos columnas: una con las densidades celulares GFAP⁺BrdU⁺/mm² para cada región a distintos tiempos, y otra columna que indica el porcentaje de aporte de las células GFAP⁺BrdU⁺ al total de células BrdU presentes en la médula. Los valores porcentuales son extraídos a partir de los conteos celulares absolutos (no aparece). No se muestran los valores de densidad total pues supondría la homogenización morfológica y tisular de la médula.

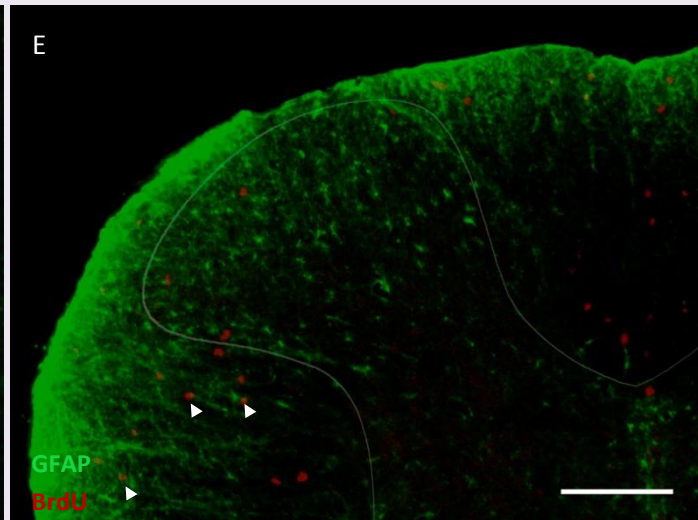
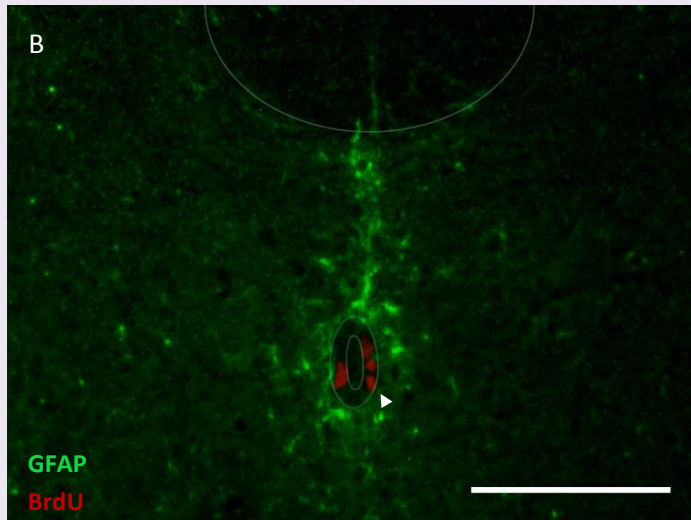
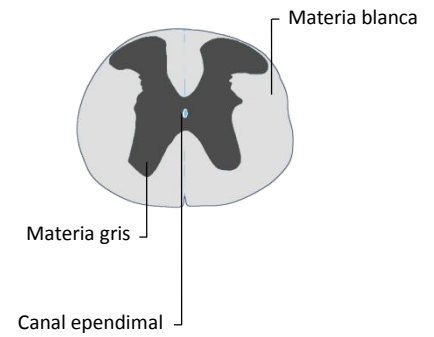
A

CERVICAL

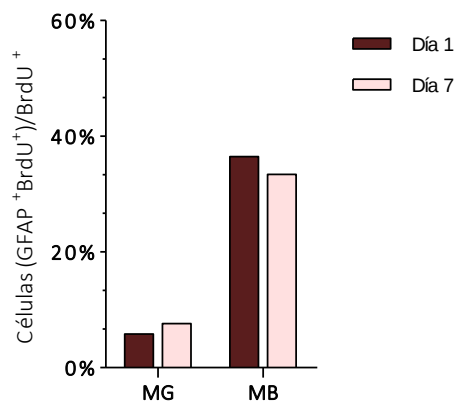


D

TORÁCICA

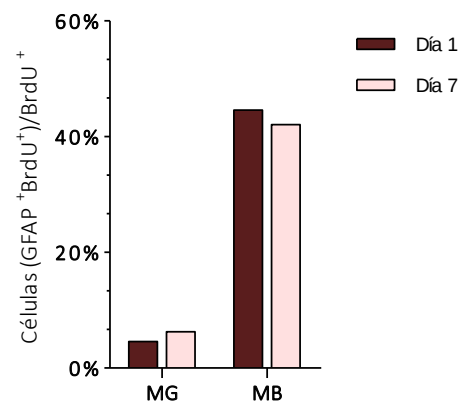


C



Región de la médula espinal

F



Región de la médula espinal

Figura 13. Proliferación de células GFAP⁺ en sección cervical: Esquema de la MB y MG de la región cervical (A). Las células BrdU⁺ del canal central no son positivas para GFAP (B). Proporción de aporte de las células GFAP⁺/BrdU⁺ al total de células en proliferación en región cervical de la MG y MB (C). Esquema de MG y MB torácica (D). Expresión de las células GFAP⁺/BrdU⁺ en la periferia de la MB perteneciente a la región torácica (E). Proporción de aporte de las células GFAP⁺/BrdU⁺ al total de células en proliferación en la región cervical de la materia gris (MG) y blanca (MB) **Barras:** 100µm. Los valores fueron obtenidos a partir de N=3 animales para cada condición.

5.3.3 Oligodendrocitos

La capa ependimal ubicada en el canal central de la médula espinal no muestra reactividad al marcador de progenitores de oligodendrocitos (NG2) en la región cervical para cada una de las condiciones temporales (D1 y D7). Se observa que la MB contiene 47.9% (D7: 42.5%) de las células BrdU⁺ que se encuentra en médula de la región cervical, siendo todo este aporte realizado por células NG2. Respecto a las materia gris, las células NG2⁺/BrdU⁺ allí contenidas aportan el 10% del total de células BrdU en la médula.

En el caso de la región torácica, la MB comprende cerca del 51.9% (D7: 36.7%) de las células BrdU, todo esto mediante el aporte de las células NG2⁺/BrdU⁺.

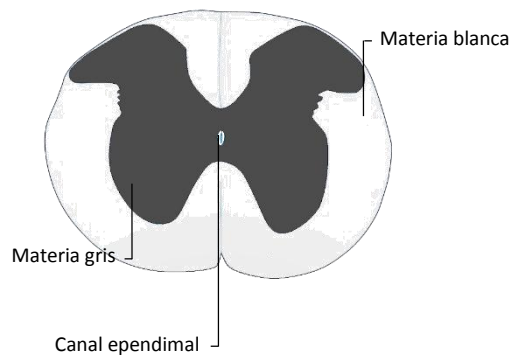
Los análisis estadísticos demuestran que los progenitores de oligodendrocitos en proliferación poseen una distribución heterogénea entre la MB y MG de la región cervical de día 1 [$F(1,2) = 10.41$, $P < 0.05$] y día 7 [$F(1,2) = 22.54$, $P < 0.05$]. Esto mismo sucede con la región torácica para ambas condiciones (día 1 [$F(1,2) = 6.81$, $P < 0.05$] y día 7 [$F(1,2) = 17.51$, $P < 0.05$]).

	Células NG2 en proliferación							
	CERVICAL				TORÁCICO			
	NG2 ⁺ BrdU ⁺ /mm ²		Porcentaje		NG2 ⁺ BrdU ⁺ /mm ²		Porcentaje	
	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7
Ependimal			0,0%	0,0%			0,0%	0,0%
MG	17.5 ± 2.2	17.8 ± 3.4	10,6%	11,5%	18.6 ± 6.1	18.5 ± 2.8	4,7%	9,9%
MB	77.4 ± 11.3	62.9 ± 2.2	47,9%	42,5%	127.0 ± 19.3	41.7 ± 5.2	51,9%	36,5%
TOTAL			58,0%	54,0%			56,7%	46,5%

Tabla 7. Densidad de células NG2⁺/BdU⁺. La primera fila refiere a la capa ependimal, seguida por MG y MB. Se muestran dos columnas: una con las densidades celulares NG2⁺BrdU⁺/mm² para cada región a distintos tiempos, y otra columna que indica el porcentaje de aporte de las células NG2⁺BrdU⁺ al total de células BrdU presentes en la médula.

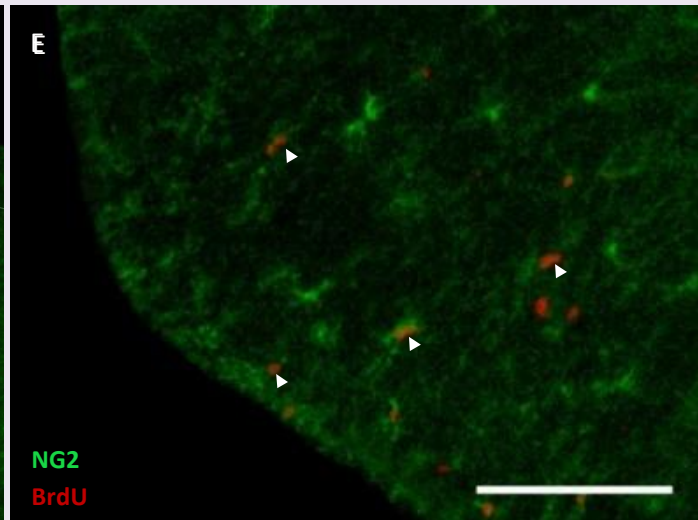
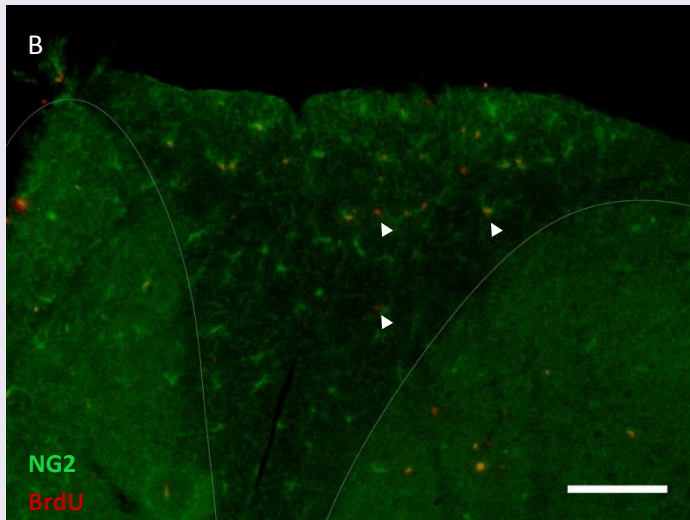
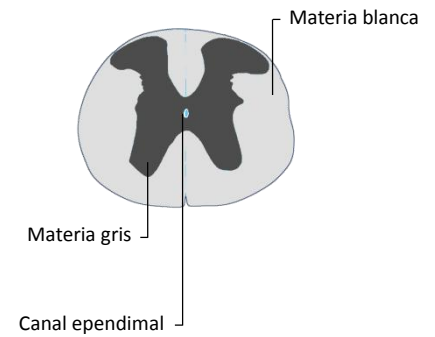
A

CERVICAL

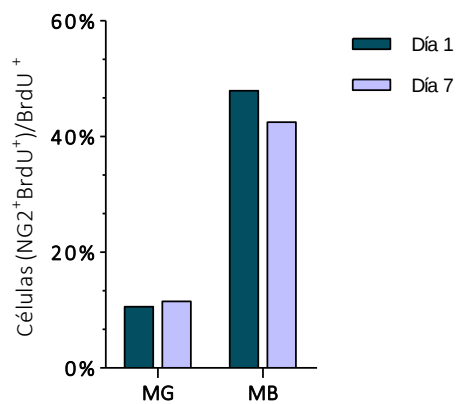


D

TORÁCICA

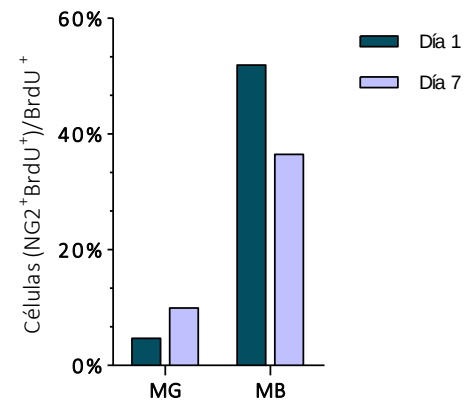


C



Región de la médula espinal

F



Región de la médula espinal

Figura 14. Proliferación de células NG2⁺ en sección torácica: Esquema de la MB y gris de la región cervical (A). Células NG2⁺/BrdU⁺ en el funículo dorsal de la región cervical (B). Proporción de aporte de las células NG2⁺/BrdU⁺ al total de células en proliferación en región cervical de la MG y MB (C). Esquema de MG y MB torácica (D). Expresión de las células NG2⁺/BrdU⁺ en la periferia de la MB perteneciente a la región ventral torácica (E). Proporción de aporte de las células GFAP⁺/BrdU⁺ al total de células en proliferación en la region cervical de la materia gris (MG) y blanca (MB) **Barras:** 100μm. Los valores fueron obtenidos a partir de N=3 animales para cada condición.

5.3.4 Comparación de células en proliferación en médula espinal intacta

Cerca del 90% de las células que se encuentra en proliferación a nivel de la capa endodermal muestran reactividad a nestina⁺ tanto en el día 1 como en el día 7 (Figura 15A), siendo la proliferación de astrocitos y oligodendrocitos casi nula en esta capa (Figura 15B y 15C).

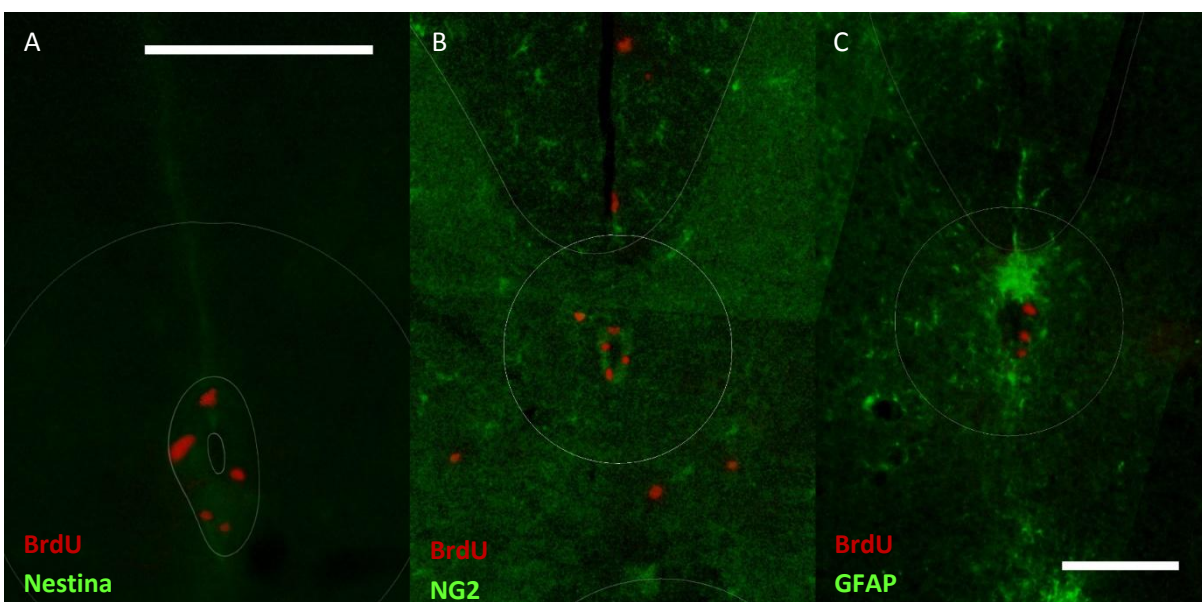
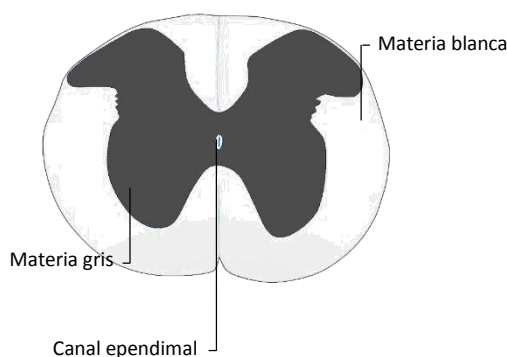


Figura 15. Caracterización de los tipos celulares que proliferan en el canal central de la médula: Canal central reactivo a nestina y BrdU: gran parte de las células positivas para el marcador de células indiferenciadas coexpresan el marcador de proliferación (A). Canal central no reactivo a NG2: en dicha región no se evidencia la presencia de oligodendrocitos en proliferación (el marcaje del canal resulta inespecífico) (B). Canal central no reactivo a GFAP: no se observan astrocitos que coexpresen el marcado de proliferación nuclear BrdU (C). **Todas las barras: 100μm.**

En los bordes de la capa endodermal se evidencia un crecimiento leve en la proliferación aportada por la línea astrocítica y de oligodendrocitos. En la MB de la médula espinal los porcentajes y densidades de células NG2⁺/BrdU⁺ y GFAP⁺/BrdU⁺ aumentan y parecen ser similares entre ellos. La figura 16 resume el aporte proliferativo de cada una de las líneas celulares en diferentes regiones de la médula espinal, es decir, cual es el fenotipo de las células BrdU de cada superficie.

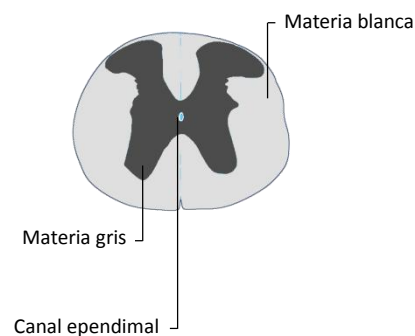
A

CERVICAL

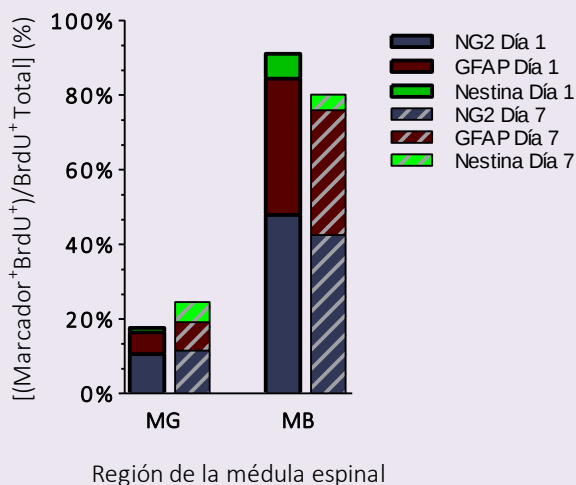


D

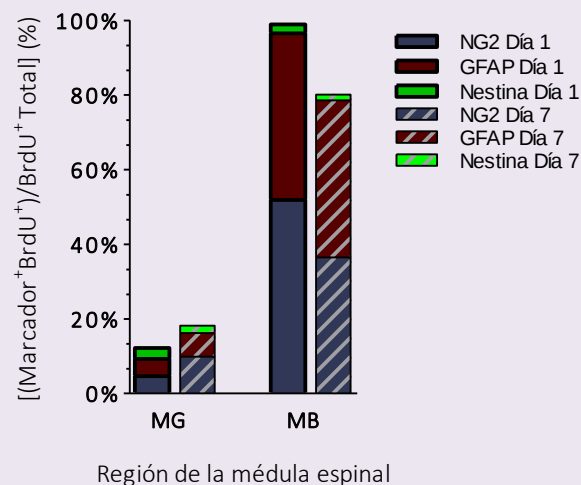
TORÁCICA



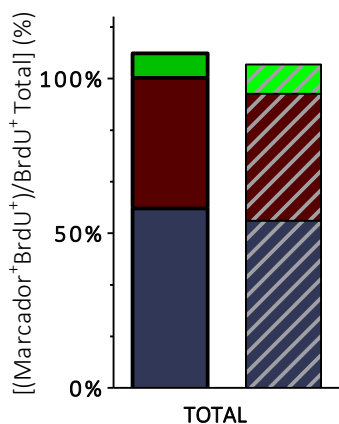
B



E



C



F

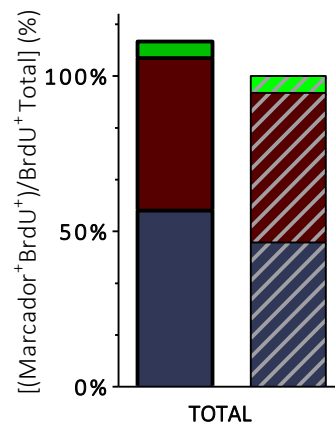


Figura 16. Resumen de fenotipos en proliferación en distintas regiones de la médula cervical y torácica: Esquemas superiores: esquemas de las áreas en médula cervical (A) y torácica (D). Gráficos: Fenotipos en proliferación en la MG y MB de la médula espinal cervical (B) y torácica (E). Aporte de cada uno de los fenotipos a la proliferación total de la médula cervical (C) y torácica (F). Se muestran día 1 y 7 (barras con líneas diagonales en blanco).

5.4 Estimación de la proliferación en médula espinal lesionada

La lesión de la médula espinal a nivel de T-9 no produce un aumento significativo [$F(1,2) = 2.01$, $P > 0.05$] en la densidad de las células BrdU⁺ de la región cervical (Figura 17A y 17B).

En la región torácica lesionada las densidades celulares aumentan de 27.5 ± 3.0 (intacto) a 92.7 ± 16.6 células BrdU⁺/mm² en la MG, mientras que en MB parte de 106.7 ± 41.4 (intacto) a 196.5 ± 28.0 células BrdU⁺/mm²; estas diferencias resultan significativas al comparar las condiciones intacto vs lesión [$F(1,2) = 9.79$, $P < 0.05$] (Figura 17D-E).

5.5 Caracterización de los progenitores en la médula espinal lesionada

La proliferación inducida por la lesión produce una modificación en el aporte de cada fenotipo, en los siguientes párrafos se describe la variación de cada uno de ellos.

5.5.1 Células endodimales

Las células endodimales (nestina⁺/BrdU⁺) del canal central muestra un aumento en su número, pasando de 0.5 ± 0.9 células en la región cervical intacta, a 4.6 ± 0.4 células nestina⁺-BrdU⁺ en la misma región bajo la condición de daño (Figura 18).

Esto mismo sucede con la región torácica, en donde la capa endodimal muestra una proliferación basal de 1.9 ± 0.6 células, aumentando a 8.3 ± 0.3 células nestina⁺-BrdU⁺ después de la lesión (Figura 18). Estos incrementos resultan estadísticamente significativos tanto para la zona cervical [$F(1,2) = 5.49$, $P < 0.05$], como para la torácica [$F(1,2) = 11.21$, $P < 0.05$].

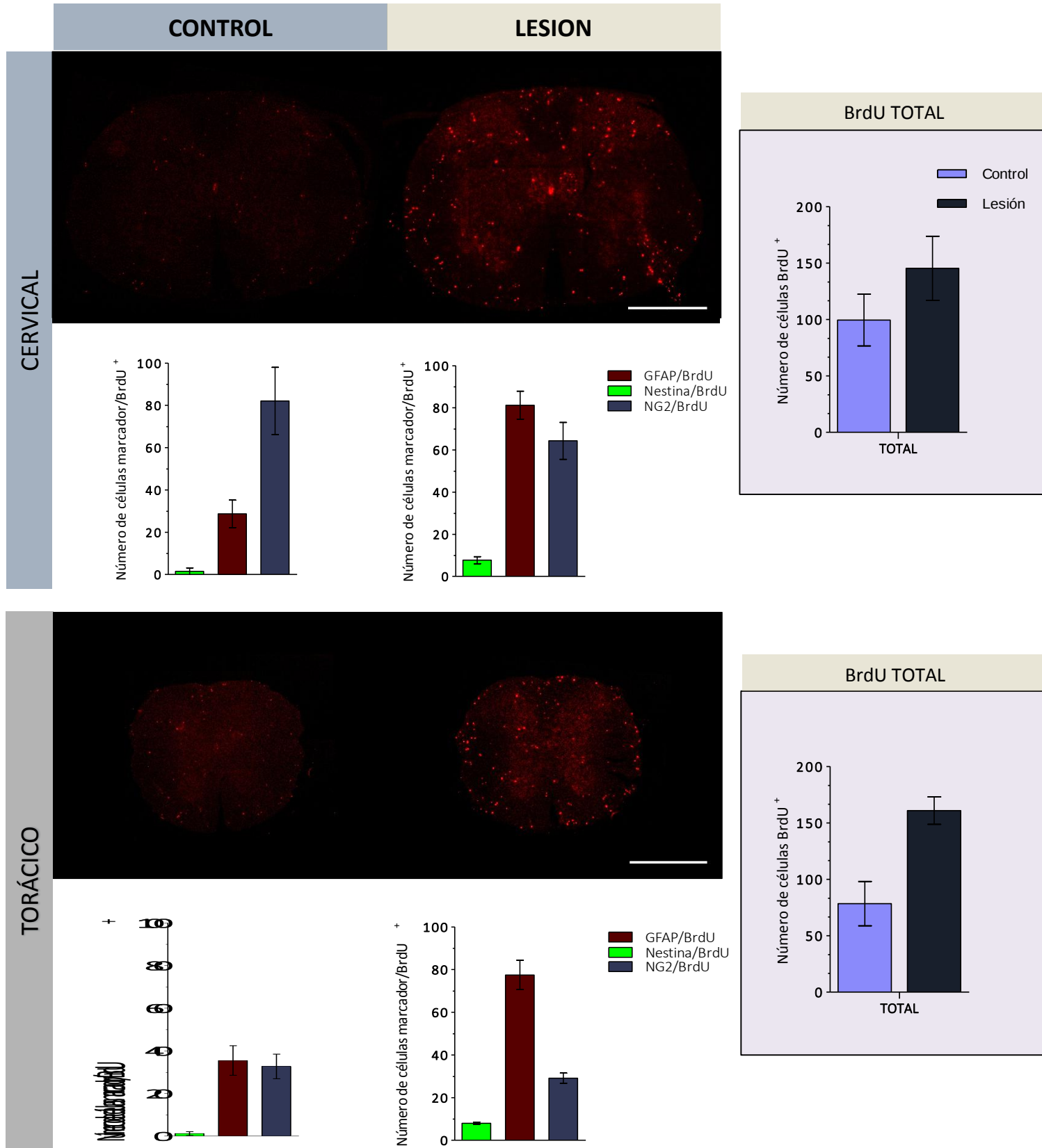


Figura 17. Determinación de la proliferación celular de la médula espinal en animales control (intactos) y lesionados: Médula espinal cervical (A) y torácica (D) de ratón control y lesionado; observe el aumento en la cantidad de puntos BrdU⁺ en esta última. Densidades BrdU⁺/mm² proliferativas en la MG y MB de las regiones medulares cervical (B) y torácica (E) de ratón control y lesionado; en azul claro los valores control, en oscuro los producidos en la lesión. Porcentaje de aporte de cada uno de los distintos fenotipos celulares a la proliferación total en la médula cervical (C) y torácica (F) para las condiciones control y lesión. N=3 animales para cada condición.

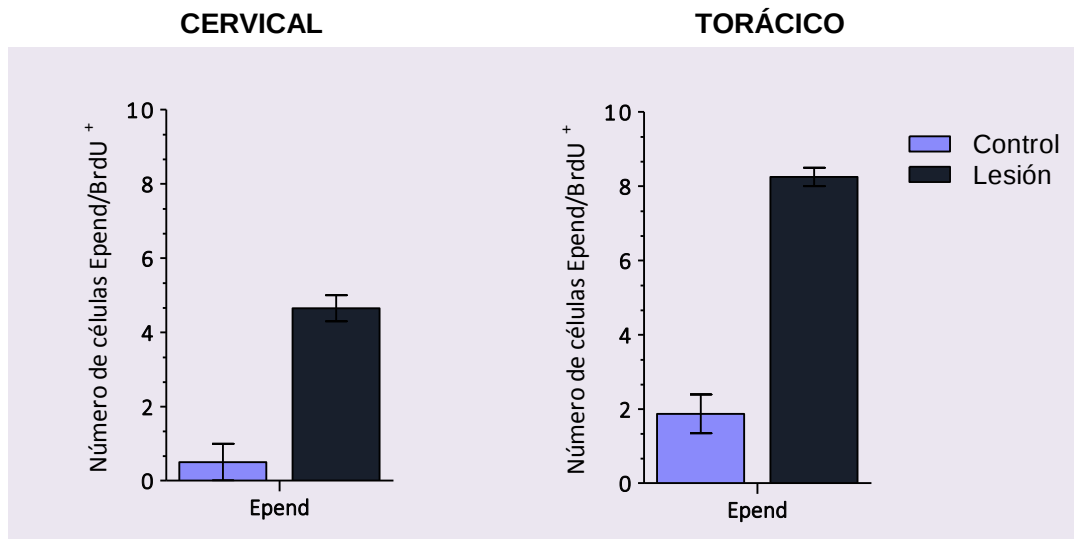


Figura 18. Estimación de la proliferación ependimal en las regiones cervical y torácica para las condiciones control y lesión: En azul claro el número total de células BrdU⁺ encontradas en la capa ependimal cervical y torácica de la médula intacta; en azul oscuro, la proliferación de esta capa en médula espinal lesionada en T9. Los valores fueron obtenidos a partir de N=3 animales para cada condición.

5.5.2 Astrocitos

Existe una variación en la cantidad de astrocitos en médula espinal producto de la lesión. La densidad de células GFAP pasa de ser 875.8 ± 208.0 en la condición intacta a 4075.0 ± 525.0 células GFAP/mm² en la región cervical lesionada.

Respecto a la región torácica dicha variación va de 1748.9 ± 299.1 (intacto) a 5400.0 ± 200.0 células GFAP/mm² en médulas con daño (Figura 19). Estas diferencias resultan significativas si se comparan las condiciones intacta vs lesión tanto para la región cervical [$F(1,2) = 5.56$, $P < 0.05$] como para la región torácica [$F(1,2) = 7.81$, $P < 0.05$].

Los análisis demostraron que la proliferación de células GFAP/BrdU resulta significativa entre las MB y MG de la región cervical [$F(1,2) = 7.28$, $P < 0.05$] y torácica [$F(1,2) = 6.34$, $P < 0.05$] bajo condición de daño.

Por otro lado, la proliferación de astrocitos (células GFAP/BrdU) en la MB intacta varía de 25.1 ± 6.3 a 56.2 ± 3.3 GFAP⁺BrdU⁺/mm² en la condición lesionada ([F(1,2) = 81.95 , P<0.05]). De modo similar, la región torácica también muestra un aumento significativo en las secciones de tejido lesionado [F(1,2) = 11.47 , P<0.05] a comparación de la proliferación basal.

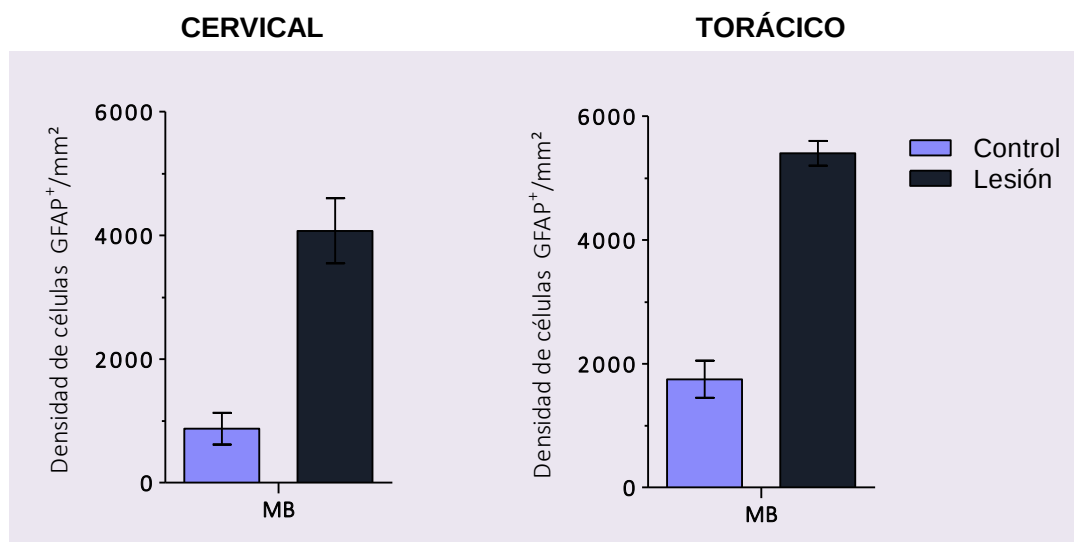


Figura 19. Densidad de astrocitos en el círculo de central de 200µm diámetro para las condiciones control y lesión: Se observa un aumento en la cantidad de astrocitos cercano a la capa ependimal en lesión. Los valores fueron obtenidos a partir de N=3 animales para cada condición. Los valores fueron obtenidos a partir de N=3 animales para cada condición.

5.5.3 Oligodendrocitos

Al igual que en los análisis de neurogénesis en médula intacta, la proliferación de las células NG2/BrdU varía entre las MG y MB de las regiones cervical [F(1,2) = 8.21 , P<0.05] y torácica [F(1,2) = 8.21 , P<0.05] lesionadas por separado.

Por otro lado, si se comparan las condiciones intacta *versus* lesión de ambas regiones se encontrara que no existen diferencias significativas; esto parece indicar que la lesión no produce un aumento en la proliferación de las células oligodendrocíticas, más si en la proliferación de astrocíticos y células ependimales.

5.5.4 Comparación de células en proliferación en médula espinal lesionada

Los astricitos y células endodimales aumentan su densidad luego de la lesión, adquiriendo el primero de ellos un porcentaje mayor de aporte en el total de células en proliferación. Así, las células GFAP/BrdU pasan de contribuir del 42.2% (intacto), al 61.9% del total de las células BrdU en la región cervical bajo la condición de daño. Respecto al fenotipo endodimal, mantiene similar su aporte al BrdU global post-lesión (cervical). Esto no significa que no exista un aumento en el número de células endodimales nestina⁺: como se relató en secciones anteriores la cantidad de células endodimales del canal central pasa de 0.5 ± 0.9 células en la región cervical intacta a 4.6 ± 0.4 células nestina⁺-BrdU⁺ en la condición de daño. Esto mismo sucede con la región torácica, en donde la capa endodimal muestra una proliferación basal de 1.9 ± 0.6 células y aumenta a 8.3 ± 0.3 células nestina⁺-BrdU⁺ con la lesión.

En ambos casos existe una reducción en el aporte de los oligodendrocitos una vez ha sido generada la lesión (Figura 20).

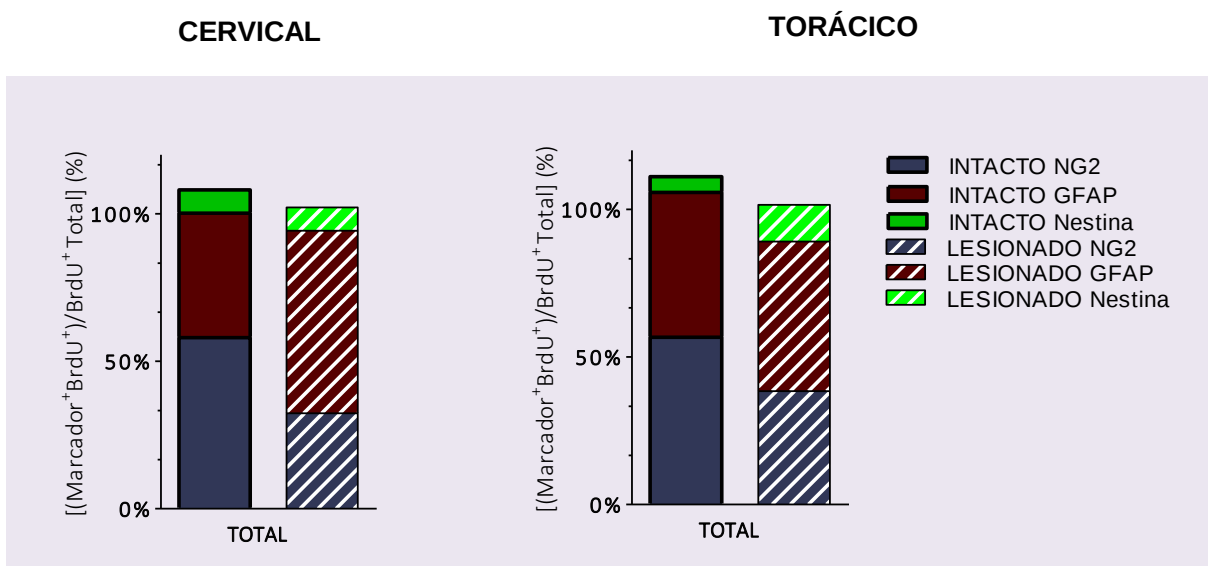


Figura 20. Totalización de los fenotipos en proliferación en médula espinal control versus lesionada: Las barras en rojo representan cual porcentaje de todas las células BrdU es aportado por los astricitos en proliferación; en azul el porcentaje aportado por oligodendrocitos y en verde el de las células endodimales. Las barras punteadas en negro representan la condición de daño.

5.6 Estimación de la proliferación en médula espinal intacta y lesionada mediante el marcador KI67

Se utilizó el marcador KI67 para estimar la proliferación celular en animales no lesionados y lesionados. Los resultados obtenidos aunque similares en su tendencia, su magnitud es muy superior con respecto a los valores de densidad obtenidos con el BrdU.

Así la densidad de células KI67 en MG de médula espinal cervical intacta alcanza valores de $594,3 \pm 32,5$ células KI67⁺/mm², mientras que para la misma condición la región torácica se tienen valores de $918,1 \pm 50,2$ células KI67⁺/mm²; esto representa un aumento de 790,2% en el marcaje de células en proliferación en comparación al BrdU.

La justificación en la realización de los ratones no lesionados se fundamenta en estimar cuanto del aumento en la proliferación del modelo lesionado por compresión está condicionado a la compresión *per se*, y no al corte o remoción de parte de la vértebra. Los análisis de los inmunomarcajes de la condición no lesionada en médula cervical revelaron densidades de $792,5 \pm 39,2$ y $1265,9 \pm 54,2$ células KI67⁺/mm² en lo que respecta a la MG y MB de la región cervical, mientras que la región torácica evidencia $1138,8 \pm 60,4$ y $1557,7 \pm 52,8$ células KI67⁺/mm² respectivamente.

Por otro lado, los análisis de la condición lesionada demuestran densidades de $1234,6 \pm 81,5$ y $2030 \pm 76,9$ células KI67⁺/mm² en la MG y MB en la médula espinal cervical (Figura 21). En caso de la región torácica (sitio de lesión) los resultados demuestran concentraciones de $1912,4 \pm 43,1$ y $2502,1 \pm 83,7$ KI67⁺/mm².

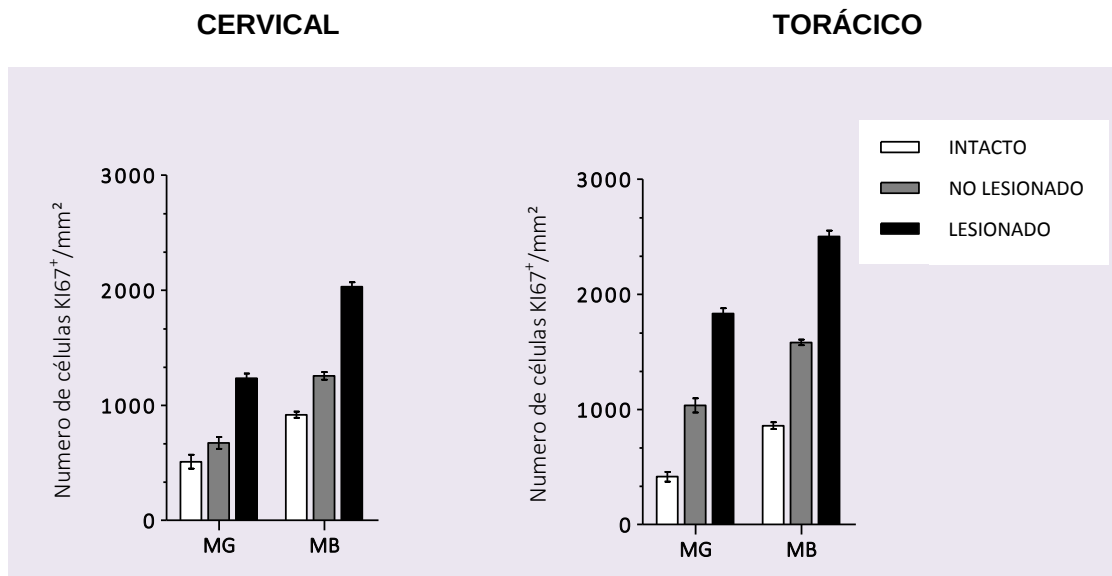


Figura 21. Densidad de células KI67 en materia gris y blanca para animales intactos no lesionados y lesionados: Las barras en blanco indican el tipo control o intacto (N=3), gris no lesionado (N=4) y negro el ratón lesionado (N=3).

Si se compara la densidad de células KI67⁺/mm² de la MB torácica de la condición intacta respecto a su contraparte lesionada se encontrará que existen diferencias significativas entre ambas [$F(1,2) = 19.19$, $P < 0.05$]; los mismos resultados se obtienen al analizar la MG.

La Tabla 8 resume cada una de las densidades de células KI67 (células KI67⁺/mm²) encontradas en cada región bajo las distintas condiciones experimentales:

	DENSIDAD PROLIFERATIVA DE CÉLULAS KI67					
	CERVICAL			TORÁCICO		
	INTACTO	NO LESIONADO	LESION	INTACTO	NO LESIONADO	LESION
MG	594,3 ± 32,5	792,5 ± 39,2	1234,6 ± 81,5	453 ± 68,4	1138,8 ± 60,4	1912,4 ± 43,1
MB	918,1 ± 50,2	1265,9 ± 54,2	2030 ± 76,9	859,2 ± 47,9	1557,7 ± 52,8	2502,1 ± 83,7

Tabla 8. Densidad de células KI67 en las regiones de MB y MG para las condiciones intacta, no lesionado y lesión. La primera columna refiere de arriba a abajo: MG (materia gris) y MB (materia blanca). Se muestran los valores de células KI67⁺/mm².

6. DISCUSIÓN

6.1 Estimación del curso temporal del síndrome parapléjico

Posterior al establecimiento de la laminectomía y/o compresión existe un periodo de 3 días en el cual hay una reducción de las capacidades motrices de los miembros anteriores de los ratones. La generación de la compresión condiciona la integridad celular de los axones y de sus células acompañantes (oligodendrocitos), dando como resultado una disminución en la transmisión de la información somato-sensorial en ambas direcciones. Durante las fases tempranas de la lesión la gliogenesis se encarga de crear una matriz con el objeto de mantener la estructura tisular; estas mismas células emiten moléculas inhibitorias de la neurogénesis, pudiendo inducir también la retracción axonal desde el sitio de daño.

La utilización recurrente de algunos circuitos específicos puede generar la liberación de factores neurotróficos que modulan la producción y diferenciación de los oligodendrocitos, induciendo con ello la remielinización de los axones dañados. Por otro lado, la disminución de los factores inhibitorios liberados por astrocitos y astrocitos reactivos aumentan las posibilidades del restablecimiento de las conexiones luego de la gliogenesis previa.

En cualquier caso, los ratones con la condición no lesionada recuperan en casi su totalidad la capacidad motora, mientras que aquellos sometidos a compresión solo logran el restablecimiento parcial de las mismas. Esto valida la posibilidad de generar modelos de lesión crónica mediante esta metodología de daño.

6.2 Estimación de la proliferación en médula espinal intacta

Utilizando esta metodología de marcaje (14 días continuos de BrdU) se apreciaron células BrdU⁺ en la capa endodermal; la mayoría de estas células se encontraban en pares indicando división celular.

Al igual que Horner y col. (2000), se observó un aumento en el marcaje BrdU⁺ en la periferia y en la MB de la región cervical y torácica a comparación de otras regiones de la médula espinal.

En estas regiones perimetrales existía mayor reactividad de BrdU hacia la región dorsal de la médula (reactividad solo significativa en secciones torácicas en el caso de día 1), específicamente en el denominado funículo posterior (*Fasciculus cuneatus* y *Fasciculus gracilis*), así como en regiones más ventrales del funículo ventral.

Las zonas de confluencia del tracto espinocerebral dorsal y ventral así como los tractos espinotalámico ventral/anterior, corticoespinal ventral/anterior y vestibuloespinal albergan un considerable número de células en fase proliferativa. Una posible explicación para la incidencia de células en proliferación hacia estas zonas del perímetro medular puede estar relacionada con el desarrollado tardío de algunos de estos tractos axonales (Barres y Raff, 1999; Burne y col., 1996). Esta hipótesis choca con el hecho de que los tractos espinocerebrales (dorsal y ventral) terminan su desarrollo en el día 7 postnatal (Arsenio Nunes y Sotelo, 1985), mientras que el tracto corticoespinal (ventral/anterior) lo hace a las dos semanas del nacimiento (Kudo y col., 1993).

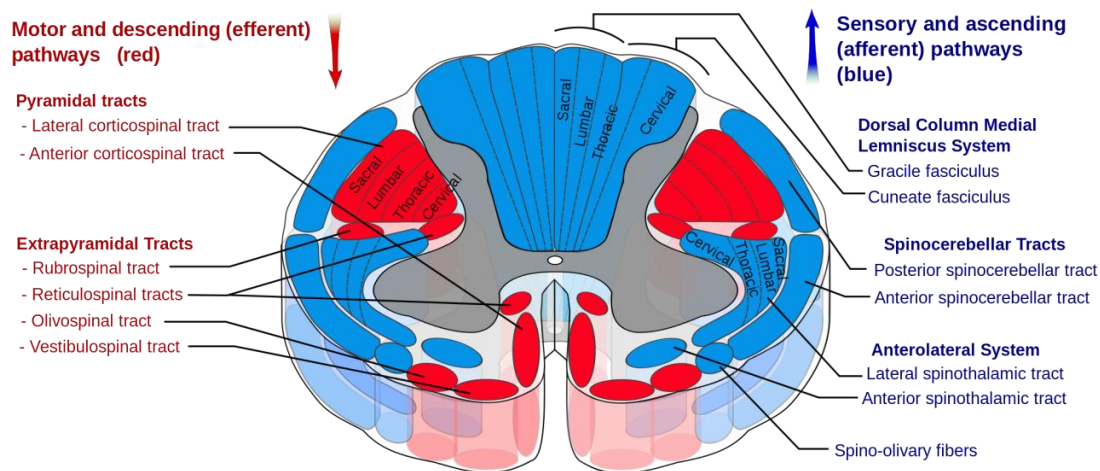


Figura 22. Esquema de una sección de la médula espinal en donde ractos ascendentes y descendentes de la médula espinal: Se muestran los tractos ascendentes y descendentes de la médula espinal. Se observó alta proliferación en las zonas perimetrales de cada una de las secciones, especialmente hacia la región donde confluyen los tractos corticoespinales y espino talámicos, así como en la región del lemnisco dorsal; todas ellas están contenidas en la MB de la médula espinal.

Los axones existentes en los tractos espinales poseen aislamiento eléctrico en pro de trasmitir correctamente los impulsos desde el órgano de control (cerebro) a los sitios de ejecución; esta actividad es realizada por los oligodendrocitos, quienes son las células residentes encargadas de la producción de mielina. El mantenimiento de esta capa en la etapa adulta requiere el recambio continuo de la misma; este es motivado por neuronas eléctricamente activas mediante la liberación de factores de crecimiento y neurotróficos, así como por la propia actividad eléctrica *per se*, regulando los eventos celulares involucrados en la expresión génica de los oligodendrocitos (Ishibashi y col., 2006). La interacción con otras células, como astrocitos, es necesaria para el mantenimiento y supervivencia tanto del axón como de las propias células gliales. Es esta continua actividad y recambio celular puede ser causa de la concentración de células BrdU en las regiones por donde transitan los tractos axonales.

6.2.1 Análisis de la densidad celular en MB y MG (Día 1)

Los análisis de las densidades celulares entre MB y MG permiten concluir que existen diferencias en la distribución de ambas poblaciones tanto en secciones cervicales como en torácicas por separado.

Un posible explicación a este fenómeno es que al contener la MB los axones ascendentes y descendentes se requiere la actividad de otras células relacionadas con la mielinización: así por ejemplo, en condiciones basales, los progenitores de oligodendrocitos son los encargados de dirigirse a los sitios de reparación (o proliferan cercano al mismo), diferenciándose posteriormente a oligodendrocitos maduros. Así, la tasa de recambio natural que puedan tener las células NG2 (mayor contribuyente de células BrdU en estado basal) sobre los axones desmielinizados puede influir en el número de células que se observan. En resumen, el comportamiento y señalización de las células en médula espinal intacta está muy poco estudiado: en este trabajo se concluye que las células en proliferación están distribuida de manera heterogénea en la médula espinal.

6.2.2 Análisis de la densidad celular en MB y MG (Día 7)

Los análisis de las densidades celulares D7 entre MB y MG concluyen que existen diferencias en la distribución de ambas poblaciones tanto en secciones cervicales como en torácicas por separado.

Si ahora se comparan los D1 vs D7 de cada una de las regiones por separado no se encontraran diferencias significativas entre su distribución, indicando que la población de células BrdU⁺ de las MB y MG se mantienen igual en el tiempo para cada una de estas regiones.

6.3 Caracterización de progenitores en médula espinal intacta

En nuestro trabajo casi la totalidad de las células BrdU⁺ coexpresaban los marcadores GFAP, NG2 o nestina; esto coincide con la bibliografía, en donde se encuentra que las células endodimales, astrocitos y oligodendrocitos representan la mayoría (93.4%) de las células marcadas con BrdU⁺ (Barnabé-Heider y col., 2010). Las células BrdU restantes están asociadas a marcadores microgliales y microvasculares, y representan aproximadamente el 2% del total de células en proliferación (Horner y col., 2000).

Nuestros resultados indican que aproximadamente 7.9% de todas las células endodimales, 8% de los oligodendrocitos y 0.2% de todos los astrocitos son BrdU⁺; resultados similares se encuentran en el trabajo de Barnabé-Heider y colaboradores (2010), quienes reportan que aproximadamente 4-5% de las células endodimales y oligodendrocitos están en fase proliferativa (BrdU⁺), mientras que un 1% lo están en astrocitos.

6.3.1 Células endodimales

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que aproximadamente 7,9% de las células en proliferación tienen un fenotipo endodimal para el día 1, expresando valores de 9,5% para el 7mo día en secciones cervicales. Se destaca el hecho de que casi la totalidad de las células en proliferación que se encuentran en el canal endodimal son caracterizadas como nestina⁺.

Los experimentos de Meletis y col. (2008) indican que las células endodimales BrdU⁺ representan el 5% de todas las células en proliferación; a su vez describen que el 20% del total de las células endodimales se encuentran en etapa de proliferación,

todo ello mediante la realización de un protocolo de marcaje totalmente diferente al desarrollado en esta investigación (Meletis y col., 2008).

En nuestro caso, la mayoría de las células nestina⁺/BrdU⁺ se visualizan en pares, indicando que la mitosis resulta en la auto replicación más que en la generación de otra célula que migra o deja el canal ependimal (Meletis y col., 2008; Barnabé-Heider y col., 2010). Esto coincide con los análisis realizados sobre el fenotipo a lo largo del tiempo, en donde no se observa aumento en las células nestina⁺ fuera de la región circunscrita al canal ependimal (con excepción de algunas regiones específicas que se describirán más adelante). Esto parece indicar que el reservorio de células ependimales es mantenido por auto replicación y que no son reemplazadas por otra población celular (Meletis, 2008). No se evidencia reactividad de los marcadores NG2 y GFAP en la capa ependimal propiamente dicha, más si en la cercanías de la misma. Estos datos podrían guardar parecido con la descripción de un hipotético nicho neurogénico expuesto por Hamilton y colaboradores (2009) a nivel del canal central.

Se encontró que la región dorsal de la MB muestra alta reactividad a la nestina específicamente en el funículo posterior (*Fasciculus cuneatus* y *Fasciculus gracilis*); las células presentes en esta región tienen morfología astrocítica, difiriendo de los somas cortos y largas proyecciones concebidas en las células ependimales del canal central. Estas células se encuentran acompañadas por grandes concentraciones de astrocitos (GFAP⁺) y oligodendrocitos (NG2⁺). Este fenómeno fue visible únicamente en la región cervical y la causa de ello puede estar relacionada con la alta vascularización en esta región de la médula espinal, así como a la generación de astrocitos reactivos y la presencia de células endoteliales.

6.3.2 Astrocitos

Las células reactivas a GFAP están distribuidas tanto en la MG como en MB. Estas se agrupan especialmente en y hacia la periferia de la MB. En la MG, su distribución aumenta hacia las zonas dorsal y ventral de la capa endodimal, destacando que nunca están presentes en la región endodimal misma. Toda esta descripción coincide con las observaciones realizadas por Horner (2000), Meletis (2008) y Barnabé-Heider (2010) y colaboradores.

La distribución de las células GFAP/BrdU hacia la periferia de la MB parece guardar relación con la confluencia de los tractos axonales anteriormente nombrados. En estas regiones se crean interacciones entre las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, las cuales son básicas para el mantenimiento de la homeostasis.

En el 2008, Cahoy demuestra que la mayoría de los genes expresados en los astrocitos están relacionados con el metabolismo de aminoácidos, ácidos grasos y con el ciclo de Krebs, mientras que en los oligodendrocitos se expresan genes relacionados con la mielinización. Así, uno de los procesos que ejemplifica la integración de funciones es la obtención de energía mediada por astrocitos y oligodendrocitos; cuando los niveles de demanda energética son altos la glucosa se oxida y forma piruvato, el cual tiende a su vez a producir lactato. Este lactato es transferido a las neuronas mediante transportadores para generar NAD^+ el cual se usa nuevamente para la producción de piruvato (y posterior ingreso al ciclo de Krebs).

Diversos estudios afirman que la disfuncionalidad en alguna de las vías de transmisión de lactato puede conllevar a una disminución en el suministro de energía a la neurona, y por tanto, a la muerte de la misma (Youngjin, 2012).

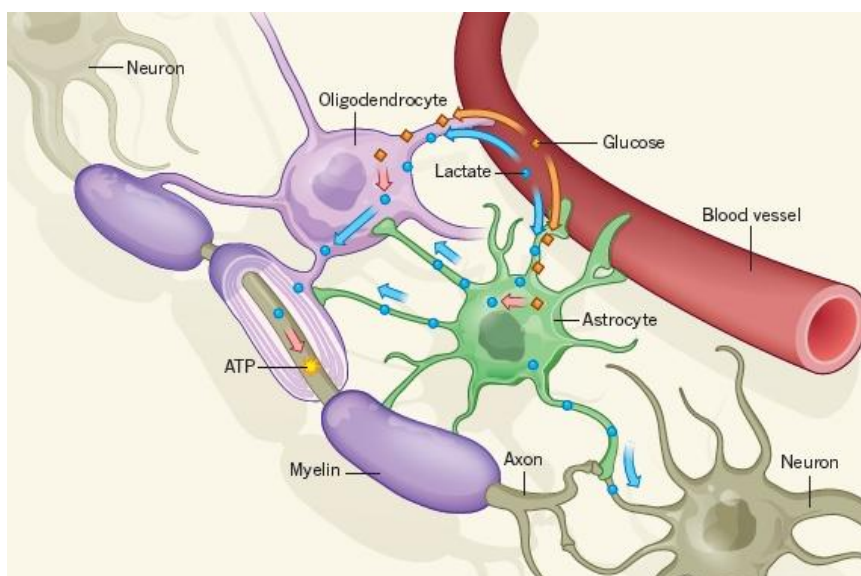


Figura 23. Transmisión energética de astrocitos y oligodendrocitos a la neurona. Durante las fases de demanda energética alta la glucosa, proveniente de los vasos sanguíneos, se oxida en astrocitos y oligodendrocitos y forma piruvato y lactato. Este lactato es transferido a las neuronas mediante transportadores para generar NAD^+ el cual se usa nuevamente para la producción de piruvato (y posterior ingreso al ciclo de Krebs).

Por otro lado, nuestros resultados permiten sugerir que casi la mitad de las células en proliferación poseen fenotipo de astrocitos. Este resultado contradice lo establecido por Barnabé-Heider y colaboradores (2010) quienes reportaron que menos de un 5% de las células BrdU^+ en toda la médula son astrocitos, esto después de administrar durante 5 semanas BrdU vía agua. Valores similares a estos obtuvieron Horner y colaboradores (2000), quienes relatan que aproximadamente el 6% de las células BrdU^+ pertenecen a dicho fenotipo, ello siguiendo una metodología de administración de BrdU similar a la del presente trabajo.

Por último, no se obtuvieron diferencias significativas entre las densidades de astrocitos en proliferación entre día 1 y día 7 de ambas regiones, indicando que la población $\text{GFAP}^+/\text{BrdU}^+$ se mantiene en el tiempo en MB y MG.

6.3.3 Oligodendrocitos

En nuestras determinaciones, se pudo establecer que la mayoría de las células en proliferación son reactivas a NG2. En un principio estas células eran definidas como progenitores gliales estrictos debido a su capacidad de diferenciación *in vitro* hacia astrocitos u oligodendrocitos; trabajos posteriores varían esta denominación a progenitores de oligodendrocitos u OPC's (Cahoy y col., 2008). En todo caso, la proporción de células BrdU pertenecientes a este fenotipo inmaduro coincide con los valores obtenidos en los experimentos de Horner (2000), quien reporta que dichas las células NG2 representan más del 70% de las células en proliferación. Valores similares fueron reportados por Barnabé-Heider y colaboradores (2010) quienes indican que 75% de las células BrdU⁺ son NG2⁺ (progenitores de oligodendrocitos).

La concentración de células NG2 (OPCs) en proliferación de la médula espinal es extremadamente reducida en la zona ependimal y sus alrededores, yendo en aumento hacia las zonas periféricas de la MB en donde encuentra mayor densidad. La concentración de estas células NG2⁺/BrdU⁺ en estas regiones puede estar relacionada con la confluencia de tractos axonales y su interacción con ellos: las señales derivadas de la actividad neuronal, así como de factores de crecimiento y actividad eléctrica, son necesarias para el desarrollo, ubicación y diferenciación de los oligodendrocitos inmaduros en pro del proceso de mielinización.

Los datos obtenidos en este trabajo demuestran que los porcentajes de proliferación de células NG2 permanecen constantes en el tiempo (D1 y D7), pudiéndose concluir que los progenitores de oligodendrocitos se auto-renuevan y generan células maduras en espina dorsal intacta.

6.3.4 Comparación entre células en proliferación

La sumatoria de porcentajes debe dar valores aproximados al 100%, puesto que el **total** de células BrdU debe corresponder a cada uno de los fenotipos caracterizados.

En este estudio fueron obtenidos valores de totalización porcentual superiores a los esperados (Cervical: 108,1% (D1) y Torácico: 111.1% (D1)). Una causa de ello puede estar relacionada con el doble marcaje que puede encontrarse en algunas de las células gliales. Así, Barnabé-Heider y colaboradores (2010) relatan que una fracción de $0.9\% \pm 0.7\%$ perteneciente a toda la línea de oligodendrocitos (progenitores y maduros) eran astrocitos (GFAP⁺) que mostraban marcadores característicos de oligodendrocitos (Olig2⁺), encontrándose todos ellos circunscritos a la MG. La mayoría de las células BrdU⁺ poseen fenotipo oligodendrocítico para ambas regiones de la médula. Seguido por este tipo celular se encuentran los astrocitos; ambos aportan casi la mitad de las células en proliferación.

6.4 Estimación de la proliferación celular en la médula espinal lesionada

Anteriormente se explicó que la lesión de la médula espinal en la región torácica no produce un aumento significativo en la densidad de las células BrdU⁺ de la región cervical, más si en lo que respecta al sitio de daño. La causa de este aumento proliferativo puede deberse a que la generación de daño celular (rompimiento axonal, apoptosis, necrosis) produce la liberación de factores de crecimiento neurales, así como por la activación de una respuesta inflamatoria que se da en el sitio de lesión.

A nivel del SNC muchos de los estudios de respuesta inmunológica a una lesión se han enfocado en los daños corticales, relegando la investigación en la médula espinal a un segundo plano. Aunque se ha demostrado la influencia que tienen las moléculas liberadas por el sistema inmune sobre los progenitores cerebrales, las causas que inducen un cambio en la proliferación de la médula espinal lesionada no son del todo claras.

La microglía es el mediador primario del sistema inmunológico en el SNC, iniciando e integrando las respuestas inflamatorias derivadas de una lesión. Estas células residentes representan del 10 al 20% del total de células de SNC. En una lesión cerebral, la microglía es capaz de secretar moléculas neurotrópicas y factores de supervivencia neuronal después de su activación (Pivneva, 2008). Una de ellas, las citosinas neuropoieticas, son un grupo de glicoproteínas reguladoras de la diferenciación, supervivencia y regeneración de múltiples células nerviosas. En corteza, las citosinas IL-6 (interleukina-6) y LIF-1 (factor inhibidor de la leucemia) inducen diferenciación astrocítica (Nakanishi y col., 2007). Si la primera de ellas se une a una proteína de fusión (sIL-6R) para formar el complejo hiper-IL-6, esta induce la diferenciación de las células madres neurales adultas (aNSC's) en neuronas sensibles a glutamato y OL's (Islam y col., 2009). Respecto a LIF-1, se ha demostrado que la exposición crónica de la molécula promueve la auto renovación de las aNSC.

Cuando la microglía es activada (lesión) por la interleukina-4 (IL-4) se produce la generación de oligodendrocitos a partir de las aNSC's, mientras que si la activación es promovida por la molécula de interferón gamma (IFN- γ) se influye en la neurogénesis. Así, diversos estudios reportan que esta molécula pro-neurogenica

influye en la diferenciación neural y en el desarrollo de la neurita (Shen, 2008) mediante la probable mediación de la vía de Quinasas c-Jun N-termina (JNK).

Otros trabajos indican que el factor de necrosis tumoral (TNF- α) juega un efecto en la regulación positiva de la neurogénesis, así como la formación de neuroesferas mediante la reducción de la apoptosis de las aNSC.

La descripción de cómo estas moléculas afectan la neurogénesis en el cerebro puede ayudar a entender mejor sobre el efecto del daño en la proliferación en médula espinal, pues al pertenecer a un mismo sistema (SNC), se deben encontrar similitudes entre las respuestas de las células nerviosas de cada una.

6.5 Caracterización de los progenitores en la médula espinal lesionada

6.5.1 Células endodimales

La cuantificación de células endodimales (nestina⁺) siempre estaba acompañada con reactividad al anticuerpo BrdU a nivel del canal central. Esto confirma el hecho de que casi todas las células endodimales se encuentran en fase de proliferación. Esto coincide con la descripción de Barnabé-Heider y colaboradores (2010), quienes relata que cerca del 80% de las células endodimales son reactivas a BrdU cinco días después de la lesión, ello bajo un protocolo de incisión del funículo dorsal y administración de BrdU en agua.

Aunque las diferencias entre MG y MB de las secciones cervicales intactas vs lesionadas no resultan significativas, se puede afirmar que existe un cambio en la proliferación de la capa endodimal en lo que respecta a la médula espinal cervical lesionada. La razón de este comportamiento es aún desconocida (Meletis y col., 2008;

Barnabé-Heider y col., 2010); una teoría que pudiera explicar esto radica en la influencia directa que tiene la irrigación del líquido cefalorraquídeo del canal central sobre la capa endotelial. Dicho volumen puede presentar un aumento en la concentración de moléculas inflamatorias (citoquinas) y de factores relacionados con la inducción mitótica provenientes de la respuesta cerebral o inmunológica al daño y que pudieran llegar a los distintos niveles de la médula vía ventricular (canal central y espacio subaracnoideo).

Las células endoteliales están normalmente restringidas al canal central de la médula espinal, pero luego de una lesión estas células se encuentran en otras regiones de la médula espinal.

Fuera del canal central existe un pool de las células nestina⁺ que resulta también positivo para el marcador GFAP⁺. Se ha demostrado que luego de una lesión los astrocitos reactivos comienzan la expresión de la proteína ácida fibrilar glial, desarrollando una morfología estrellada pero con proyecciones y somas mucho más grande que las diferencia de la morfología típica de un astrocito (los astrocitos reactivos no muestran reactividad a BrdU). Si se realiza la discriminación de estas células nestina⁺/GFAP⁺ mediante análisis cito morfológicos, es posible la visualización de algunos astrocitos nestina⁺ que se concentran cerca del canal central.

Los estudios de Barnabé-Heider y colaboradores (2010) indican, mediante el uso de ratones transgénicos, que cerca del 39% de las nuevas células astrocíticas provienen de la diferenciación de células endoteliales (EpCs). En nuestro trabajo se encontró que aproximadamente 3% del total de la progenie de astrocitos tienen origen endotelial.

Este valor es obtenido mediante el conteo de células GFAP⁺/nestina⁺ y GFAP⁺/nestina⁻, las cuales pueden definirse como astrocitos maduros *con* y *sin* expresión de nestina respectivamente. Este cálculo no toma en cuenta el aporte de las EpCs que ya no muestra reactividad contra el marcador nestina, esto debido a que los fenotipos astrocíticos GFAP⁺/nestina⁻ pueden provenir tanto de progenitores de astrocitos como de las propias células endodiales. Del conteo de las células GFAP⁺/nestina⁺ se descartan los valores de astrocitos reactivos, esto aplicando análisis morfológicos a las células. La figura 25 ejemplifica lo anteriormente expuesto:

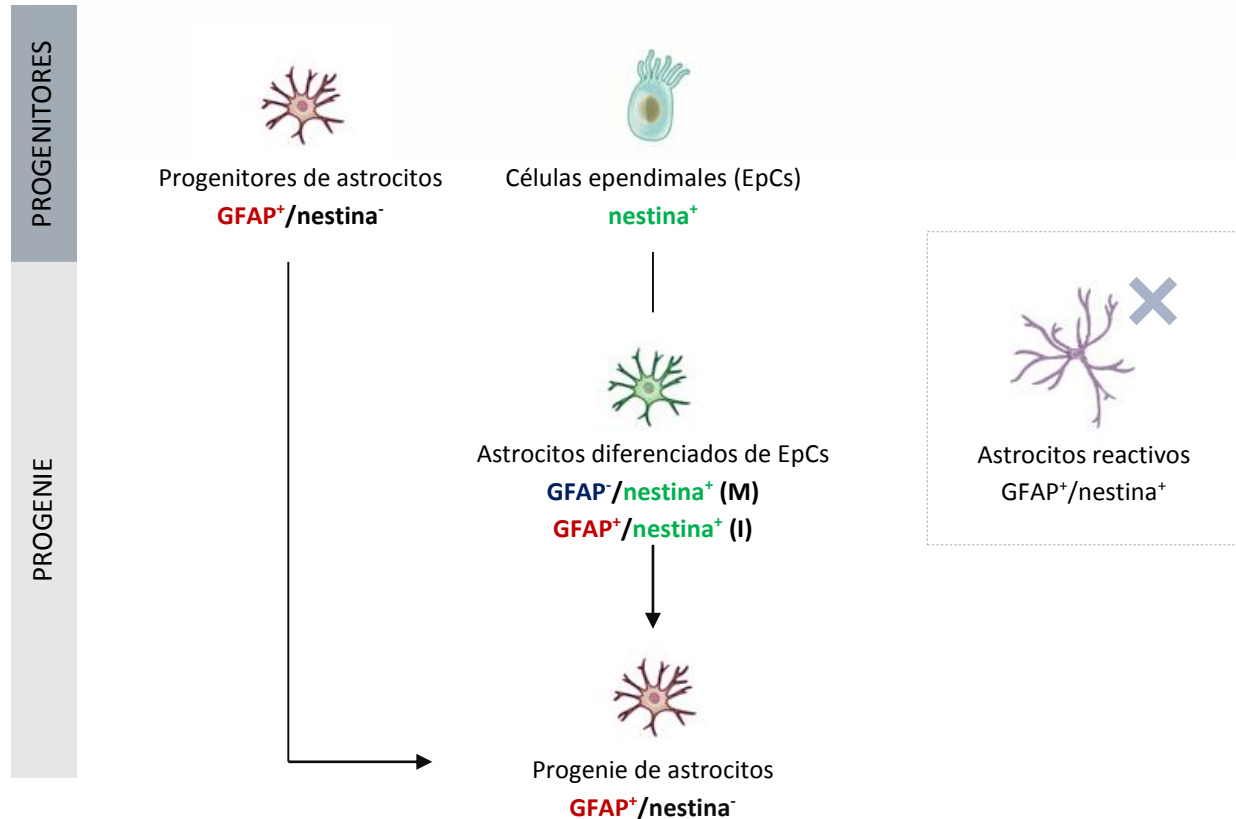


Figura 25. Marcadores de los progenitores de astrocitos y células endodiales en la médula espinal: Se observa que el marcaje de los progenitores de astrocitos coincide con el marcaje de su progenie (ambos son GFAP⁺/Nestina⁻), esto hace imposible distinguir sin el uso de animales transgénicos la procedencia de la descendencia astrocítica. Por ello solo fue posible la cuantificación de células GFAP⁻/Nestina⁺ y GFAP⁺/Nestina⁺ como descendencia de las células endodiales. Para el conteo real de las primeras se realizó un análisis morfológico de las células nestina⁺ con morfología astrocítica (**M**), mientras que para las segundas solo fue necesaria la obtención de la coexpresión (**I**), descartando de ellas las células con anatomía reactiva (también GFAP⁺/Nestina⁺).

Un pool casi insignificante de células Nestina⁺ muestra reactividad al anticuerpo NG2. Estas células pueden ser caracterizadas como progenitores de oligodendrocitos derivados de la diferenciación endotelial (Meletis y col., 2008; Barnabé-Heider y col., 2010) y su distribución no parece específica a ninguna superficie medular en particular. Resultados algo parecidos obtuvo el equipo de Barnabé-Heider (2010), indicando que 3.2% de los nuevos oligodendrocitos provienen de las células endoteliales 4 meses después de la lesión.

Por último, existe una pérdida en el marcaje de las células nestina positiva en el día 7 respecto al 1, esto tanto para la región cervical como para la región torácica. La causa de esto está relacionada con los procesos de diferenciación de las células endoteliales hacia la línea astrocítica y oligodendrocítica. Se concluye que las células endoteliales tienen capacidad de diferenciarse hacia la línea astrocítica, y en un menor grado, hacia oligodendrocitos. Esta capacidad multipotente fue observada tanto en el sitio de lesión como en la región cervical adyacente.

6.5.2 Astroцитos

Como se mencionó con anterioridad, el efecto de moléculas señalizadoras producto de la respuesta inmunitaria y/o de la liberación de factores de crecimiento nerviosos puede inducir la proliferación de las células endoteliales o de los progenitores de astroцитos.

Los equipos de Meletis (2008) y Barnabé-Heider (2010) describen que la progenie astrocítica proveniente de los progenitores endoteliales posee dos subtipos diferentes: uno GFAP⁻ y otro GFAP⁺ (Figura 25). El primero de ellos es más común en

las regiones donde existe daño y conforma la mayoría de la progenie ependimal, mientras que el segundo se encuentra en pequeñas densidades celulares. Ambos equipos llegaron a estas conclusiones mediante el uso de ratones transgénicos con el promotor FoxJ1. Así, la progenie astrocítica puede descender tanto de progenitores ependimales como de progenitores de astrocitos; los primeros de ellos pueden mostrarse como GFAP⁺/nestina⁺ o GFAP⁻/nestina⁺ (mayor en cantidad), mientras que los segundos son todos GFAP⁺ (Figura 25).

Como se explicó en la sección de resultados, existe una mayor proliferación de las células GFAP y GFAP/BrdU hacia la periferia medular, lo cual puede estar relacionado con la confluencia de los tractos axonales en esas regiones, así como con la interacción de las zonas más externas de la médula con estructuras endoteliales y vasos presentes en la aracnoides y en el espacio subaracnoideo.

6.5.3 Oligodendrocitos

La distribución de las células NG2/BrdU se mantiene igual en las regiones cervicales y torácicas lesionadas he intacta. Esto coincide con las observaciones realizadas por los equipos de Meletis (2008) y Barnabé-Heider (2010), quienes afirman que los progenitores de oligodendrocitos mantienen su tasa de duplicación post lesión similar a los valores de la médula intacta.

La distribución sigue teniendo el mismo patrón que el encontrado en las secciones de médula intacta: mayor proliferación hacia la periferia medular y en las áreas de la MB de la médula espinal. La causa de ello, al igual que en el caso de los astrocitos, puede estar relacionada con la confluencia de los tractos axonales en dichas regiones.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con las observaciones de Meletis y colaboradores (2008) respecto al origen de la progenie oligodendrocítica; casi la totalidad de los nuevos oligodendrocitos en médula espinal lesionada provienen de progenitores NG2 (pues existe una ínfima cantidad de células NG2⁺/nestina⁺).

6.5.4 Comparación entre células en proliferación

A nivel de la médula espinal lesionada se observa una variación parcial en los fenotipos en proliferación del día 1 respecto al día 7.

Las células ependimales aportan el 3.0% (Cervical) al total de células BrdU en el primer día y reducen su proliferación en el tiempo. Este proceso es común en las regiones cervical y torácica, y puede estar relacionado con una disminución en la liberación de factores de crecimiento que excitan la proliferación ependimal una vez se reduce la respuesta inflamatoria.

Tanto en la región cervical como en la región torácica existe un aumento en la proliferación de astrocitos. Como se explicó con anterioridad, el conteo de GFAP/BrdU puede incluir la actividad proliferativa de los progenitores de astrocitos y/o células ependimales (posteriormente diferenciadas). En todo caso, la proliferación y diferenciación a la línea de astrocitos supera en número a la de los oligodendrocitos, de modo contrario a lo sucedido en ambas regiones bajo a condición intacta.

Como se ha expresado con anterioridad, se desconoce cuáles son las vías de señalización que inducen la proliferación de los distintos tipos celulares en la médula espinal. Lo que sí ha sido comprobado en múltiples estudios es que la primera respuesta del tejido del SNC ante un daño consiste en la astrogliosis, ello en pro de aislar la lesión del tejido funcional remanente y de mantener la integridad física tisular.

Al contrario de la región cervical, la proliferación de astrocitos en la región torácica aumenta en el tiempo. La causa de ello podría estar relacionada con que la mayoría de la progenie astrocítica derivada de las células ependimales; estas muestran poca reactividad al marcador GFAP⁺, causando una disminución en la cuantificación de células GFAP⁺/BrdU⁺. A medida estas células maduran, comienzan la expresión de este marcador, derivando en la recuperación de la población y el aumento en la cuantificación GFAP⁺/BrdU⁺ en el día 7.

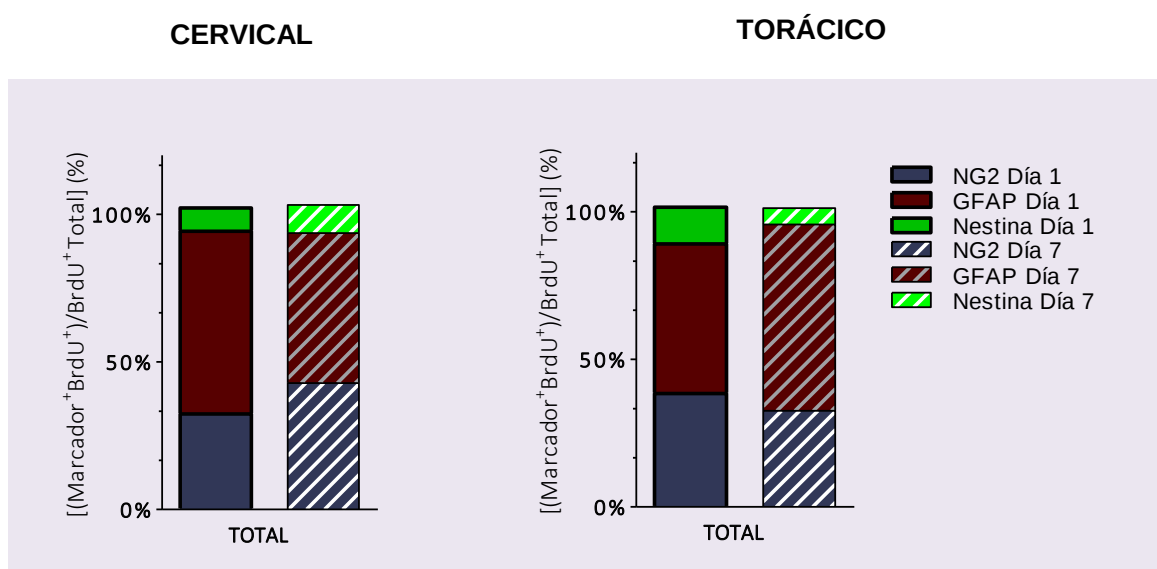


Figura 26. Porcentaje de fenotipos respecto al total de células en proliferación en médula espinal bajo la condición lesionada. Las barras rayadas representan D7 experimental. N=3 para cada condición.

6.6 Estimación de la proliferación en médula espinal intacta y lesionada mediante el marcador KI67

Los resultados obtenidos utilizando el anticuerpo KI67, al igual que en la inmunohistoquímica realizada con BrdU, demuestran que existen diferencias significativas entre la MB y MG de cada una de las regiones de la médula espinal para cada una de las condiciones.

Existe un aumento en la proliferación de la condición no lesionada y lesionada en todas las regiones respecto a los respectivos intactos. La causa de este aumento puede estar relacionado con lo explicado anteriormente: la generación de una lesión produce la liberación de moléculas y factores de crecimiento que inducen los procesos mitóticos y neurogenicos.

En el caso de la condición no lesionada, el proceso inflamatorio resulta del daño óseo derivado al realizar la laminectomia, mientras que la compresión medular, resulta de la afectación directa a la integridad del tejido. La magnitud de ambas lesiones sobre el sistema nervioso central influye pues en la difusión de los factores pro-mitoticos, y consecuentemente en la proliferación de las células.

La mayor reactividad de KI67 está relacionada con las fases del ciclo celular en que la molécula esta expresada; mientras que KI67 se expresa en todas las fases del ciclo activo (con excepción de G₀), el mitogeno BrdU solo es agregado al DNA en la fase S: esto, sumado a la biodisponibilidad de este último, hacen que el marcaje de KI67 sea más reactivo. Así, Kee (2001), plantea que el radio BrdU/KI67 es de aproximadamente 0.38; es decir, el marcaje con KI67 es 2,63 veces más reactivo de lo sería con BrdU.

En nuestro trabajo el número de células KI67 es en promedio 10 veces superior a lo obtenido en las inmunohistoquimicas realizadas con BrdU. La causa de ello también puede estar relacionado con posibles marcajes inespecíficos por parte de KI67 y la concentración de BrdU utilizada para inyectar los animales.

7. CONCLUSIONES

- La compresión de la médula espinal produce una lesión de carácter transitorio que conduce a una disminución en la actividad locomotora espontánea.
- La lesión espinal se traduce en la pérdida del valor relativo del índice de Basso que es indicativa de una pérdida de la actividad motriz fina: desplazamiento, posición, arrastre, coordinación.
- La proliferación celular es mayor en la materia blanca en las regiones cervical y torácica de la médula espinal de animales intactos, no lesionados y lesionados tanto para el día 1 como para el día 7.
- La compresión de la médula espinal a nivel de la vértebra T9 produce un incremento en la proliferación de la MB y MG en la región torácica.
- La compresión de la médula espinal a nivel de la vértebra T9 produce un incremento no significativo en la proliferación de la MB y MG en la región cervical, pero sí genera un aumento en la proliferación de las células de la capa ependimal en esta región.
- La compresión de la médula espinal produce un aumento en el aporte proliferativo de los astrocitos y de las células ependimales en la médula espinal de las regiones cervical y torácica.
- El aporte a la progenie astrocítica deriva de la diferenciación ependimal y de la mitosis de los progenitores de astrocitos.
- Los progenitores de oligodendrocitos aportan la mayor cantidad de células en la proliferación en la médula intacta; este aporte tiene una leve disminución en ambas regiones luego de la lesión.

8. BIBLIOGRAFIA

- Adrian Jr E.K., Walker B.E. (1962). Incorporation of thymidine-H3 by cells in normal and injured mouse spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol* 21:597– 609.
- Altman, J., Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319–335.
- Arsenio Nunes M.L., Sotelo C. (1985). Development of the spinocerebellar system in the postnatal rat. *J Comp Neurol* 237:291–306.
- B.A. Barres, M.C. Raff. (1999). Axonal control of oligodendrocyte development, *J. Cell Biol.* 147 1123–1128.
- Barnabe-Heider F., Georitz C., Sabelstrom H., Takebayashi H., Pfrieger F., Meletis K., Frisen J. (2010). Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell* 7:470–482.
- Bauer HC, Tempfer H, Bernroider G, Bauer H. (2006). Neuronal stem cells in adults. *Exp Gerontol* 41:111–116.
- Burne J.F., Staple J.K., Raff M.C. (1996) Glial cells are increased proportionally in transgenic optic nerves with increased numbers of axons. *J Neurosci* 16:2064 –2073.
- Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., Thompson, W. J. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *The Journal of Neuroscience*, 28(1), 264-278.
- Carlén, M., Meletis, K., Barnabé-Heider, F., and Frisén, J. (2006). Genetic visualization of neurogenesis. *Exp. Cell Res.* 312, 2851–2859.
- Copp A.J., Brook F.A., Estibeiro J.P., Shum A.S.W., Cockroft D.L. (1990). The embryonic development of mammalian neural tube defects. . *Prog. Neurobiol.* 35:363–403
- Corti, S., Nizzardo, M., Nardini, M., Donadoni, C., Locatelli, F., Papadimitriou, D., Salani, S., Del Bo, R., Ghezzi, S., Strazzer, S. (2007). Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on Prominin-1 expression. *Exp. Neurol.* 205, 547–562.
- Coskun V., Wu H., Bianchi B., Tsao S., Kim K., Zhao J., Biancotti J., Hutnick L., Krueger R.J., Fan G. (2008). CD133 neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1026–1031.
- Cote SL, Ribero-da-Silva A, Cuello AC. (1994). Current protocols for light microscopy immunocytochemistry. *Immunohistochemistry II*, Cuello AC, editor. Chichester: John Wiley & Sons. *Biotechnology* 10 (86): 19929–40. doi:10.5897/ajbx11.046
- Crowe, M.J., Bresnahan, J.C., Shuman, S.L., Masters, J.N., and Beattie, M.S. (1997). Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat. Med.* 3, 73–76.
- Del-Bigio M.R. (1995). The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia* 14:1–13.
- Doetsch F., Caille I., Lim D., García-Verdugo J., Alvarez-Buylla A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703–716.
- Frisén J., Johansson C.B., Török C., Risling M., Lendahl U. (1995). Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol* 131: 453–464.

- Goritz C., Frisen J. (2012). Neural stem cells and neurogenesis in the adult. *Cell Stem Cell* 10:657–659.
- Gregorian C., Nakashima J., Le Belle J., Ohab J., Kim R., Liu A., Smith K.B., Groszer M., Garcia A.D., Sofroniew M.V., Carmichael S.T., Kornblum H.I., Liu X., Wu H. (2009). Pten deletion in adult neural stem/progenitor cells enhances constitutive neurogenesis. *J Neurosci* 29:1874–1886.
- Gritti A., Vescovi A., Galli R. (2002). Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential. *J Physiol* 96:81–90.
- Grossman, S.D., Rosenberg, L.J., and Wrathall, J.R. (2001). Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Exp. Neurol.* 168, 273–282.
- Hamilton L.K., Truong M.K.V, Bednarczyk M., Aumont A., Fernandes K.J.L. (2009). Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Neuroscience* 164:1044-1056.
- Horky, L.L., Galimi, F., Gage, F.H., and Horner, P.J. (2006). Fate of endogenous stem/progenitor cells following spinal cord injury. *J. Comp. Neurol.* 498, 525–538.
- Horner P, Power A, Kempermann G, Kuhn H, Palmer T, Winkler J, Thal L, Gage F. (2000). Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* 20:2218–2228.
- Ishibashi, T., Dakin, K. A., Stevens, B., Lee, P. R., Kozlov, S. V., Stewart, C. L., & Fields, R. D. (2006). Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron*, 49(6), 823-832.
- Islam O. 2009. Interleukin-6 and neural stem cells: more than gliogenesis. *Mol Biol Cell*;20(1):188–99.
- Johansson C.B., Momba S., Clarke D.L., Risling M., Lendahl U. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96: 25–34.
- Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R., & Wojtowicz, J. M. (2002). The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *Journal of neuroscience methods*, 115(1), 97-105.
- Kohan, D. E., Ge, Y., Bagnall, A., Stricklett, P. K., Webb, D., & Kotelevtsev, Y. (2010). Combined knockout of collecting duct endothelin A. *Am J Physiol Renal Physiol*, 299(6), F1424-F1432.
- Kudo N., Furukawa F., Okado N. (1993). Development of descending fibers to the rat embryonic spinal cord. *Neurosci Res* 16:131–141.
- Lee, Y., Morrison, B. M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M. H., Hoffman, P. N., Pellerin, L. (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*, 487(7408), 443-448.
- Lepore, A. C. and Fischer, I. (2005). Lineage-restricted neural precursors survive, migrate, and differentiate following transplantation into the injured adult spinal cord. *Exp Neurol.* 194, 230–242.
- Lim D, Tramontin A, Trevejo J, Herrera D, Garcia-Verdugo J, Alvarez-Buylla A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28:713–726.
- Lois, C., Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2074–2077.
- Martens D., Seaberg R., van der Kooy D. (2002). In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord. *Eur J Neurosci* 16:1045–1057.

- Meletis K., Barnabe-Heider F., Carlen M., Evergren E., Tomilin N., Shupliakov O., Frisen J. (2008). Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol* 6:e182.
- Mitsui, T., Shumsky, J. S., Lepore, A. C., Murray, M. and Fischer, I. (2005) Transplantation of Neuronal and Glial Restricted Precursors into Contused Spinal Cord Improves Bladder and Motor Functions, Decreases Thermal Hypersensitivity, and Modifies Intraspinal Circuitry. *J Neurosci* 25, 9624-9636.
- Moreno-Manzano, V., Rodríguez-Jiménez, F.J., García-Roselló, M., Laínez, S., Erceg, S., Calvo, M.T., Ronaghi, M., Lloret, M., Planells-Cases, R., Sánchez-Puelles, J.M., and Stojkovic, M. (2009). Activated spinal cord ependymal stem cells rescue neurological function. *Stem Cells* 27, 733–743.
- Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Craig, C.G., McBurney, M.W., Staines, W.A., Morassutti, D., Weiss, S., and van der Kooy, D. (1994). Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13, 1071–1082.
- Nagy, J.I., Patel, D., Ochalski, P.A., and Stelmack, G.L. (1999). Connexin30 in rodent, cat and human brain: Selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience* 88, 447–468.
- Nakanishi M. (2007). Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *Eur J Neurosci*;25(3):649–58.
- Namiki, J., & Tator, C. H. (1999). Cell proliferation and nestin expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 58(5), 489-498.
- Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., and Zhu, X. (2009). Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 10,9–22.
- Ohori Y, Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Yamamoto N, Nakamura K, Nakafuku M. (2006). Growth factor treatment and genetic manipulation stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured adult spinal cord. *J Neurosci* 26: 11948–11960.
- Oudega M, Marani E. (1991). Expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in the developing rat spinal cord: an immunocytochemical study of the spinal cord glial system. *J Anat* 179:97–114.
- Palmer, T.D., Takahashi, J., and Gage, F.H. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 389–404.
- Peters, A., & Palay, S. L. (1991). *The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells*. Oxford University Press, USA.
- Pivneva TA (2008). Microglia in normal condition and pathology. *Fiziol Zh*;54(5):81–9.
- Plemel, J. R., Duncan, G., Chen, K. W. K., Shannon, C., Park, S., Sparling, J. S., & Tetzlaff, W. (2008). A graded forceps crush spinal cord injury model in mice. *Journal of neurotrauma*, 25(4), 350-370.
- Qin, Y., Zhang, W., & Yang, P. (2015). Current states of endogenous stem cells in adult spinal cord. *Journal of neuroscience research*, 93(3), 391-398.
- Rash, J.E., Yasumura, T., Davidson, K.G., Furman, C.S., Dudek, F.E., and Reynolds, B.A., Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian nervous system. *Science* 255, 1707–1710.
- Reynolds, B.A., Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian nervous system. *Science* 255, 1707–1710.

- Robinson S.P., Langan-Fahey S.M., Johnson D.A., Jordan V.C. (1991) Metabolites, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of tamoxifen in rats and mice compared to the breast cancer patient. *Drug Metab Dispos* 19: 36–43.
- Sellers, D.L., Maris, D.O., and Horner, P.J. (2009). Postinjury niches induce temporal shifts in progenitor fates to direct lesion repair after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 29, 6722–6733.
- Shibata T., Yamada K., Watanabe M., Ikenaka K., Wada K., Tanaka K., Inoue Y. (1997). Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J Neurosci* 17: 9212–9219.
- Silva N, Sousa N, Reis R, Salgado A. (2014). From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. *Prog Neurobiol* 114:25–57.
- Smart I. (1961) The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by radioautography after thymidine-H3 injection. *J Comp Neurol* 116:325–338.
- T. Ishibashi, K.A. Dakin, B. Stevens, P.R. Lee, S.V. Kozlov, C.L. Stewart, R.D. Fields. (2006). Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses, *Neuron* 49 823–832
- Thuret S., Moon L., Gage F. (2006). Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 7:628–643.
- Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson A, Reynolds B. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16:7599–7609.
- Xu Y, Kitada M, Yamaguchi M, Dezawa M, Ide C. (2006). Increase in bFGF-responsive neural progenitor population following contusion injury of the adult rodent spinal cord. *Neurosci Lett* 397:174–179.
- Yamamoto, S., Yamamoto, N., Kitamura, T., Nakamura, K., and Nakafuku, M. (2001). Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 172, 115–127.
- Zhang R, Zhang Z, Wang Y, LeTourneau Y, Liu X, Zhang X, Gregg S, Wang L, Chopp M. (2007). Stroke induces ependymal cell transformation into radial glia in the subventricular zone of the adult rodent brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1201–1212.

9. ANEXOS

Escala de Basso:

1	Sin movimiento del tobillo
2	Movimiento leve del tobillo
3	Movimiento extensivo del tobillo
4	Colocación plantar de la pata con o sin apoyo del peso.
5	Pisada plantar ocasional
6	Pisada plantar consistente sin coordinación
7	Pisada frecuente y consistente con alguna coordinación; patas paralelas en el contacto inicial
8	Pisada frecuente y consistente con coordinación; patas paralelas en el contacto inicial y rotación de la cintura
9	Pisada plantas fuerte, coordinación casi normal.