



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dr. Esteban Rodríguez Cairo
Facultad de Medicina
Universidad Austral de Chile

Profesor Copatrocinante
Dra. Karin Vio Asenjo
Facultad de Medicina
Universidad Austral de Chile

**INVESTIGACIÓN DE LAS ALTERACIONES DE LA
NEUROGÉNESIS POSTNATAL EN LA RATA H-Tx
HIDROCEFÁLICA**

Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al Título
Profesional de *Bioquímico*.

Francisca Macarena de la Paz Castillo Castro

VALDIVIA – CHILE

2012

A mi hijo Matías por su amor y por ser mi gran motivación del día a día, y a mis queridos padres por estar siempre a mi lado brindándome todo el apoyo y confianza de manera incondicional .

Esta Tesis fue realizada en el Instituto de Anatomía, Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, y fue financiada a través de subsidios otorgados por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico a través de los proyectos FONDECYT regular N°1070241 y N°111018 a nuestro grupo de trabajo (Responsable: Dr. Esteban M. Rodríguez).

Agradecimientos

La presente tesis es fruto de un constante esfuerzo, en el cual, directa o indirectamente participaron varias personas a quienes quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento.

Agradezco a mi hermoso hijo Matías por ser mi fortaleza, mi principal motivación para conseguir mis metas, por su amor sincero que me entrega cada día y por llenarme de felicidad.

A mis queridos padres, Víctor e Ivonne, por ser el pilar fundamental en mi formación, por su constante apoyo que hicieron posible este gran logro, por confiar en mí, y darme la oportunidad de cumplir mis sueños e involucrarse en ello, alentándome y guiándome día a día.

A mis hermanos, Fabiola y Sebastián, por acompañarme en este camino, dándome consejos y ánimo para seguir adelante.

A Alex, por ser parte importante de mi vida, por estar conmigo en este proceso entregándome todo su amor, por su paciencia, comprensión, por escucharme y aconsejarme, por darme ánimo cada día, por acompañarme en los momentos difíciles y de felicidad.

A mi amiga Natalia, quien a pesar de la distancia, siempre ha estado presente, compartiendo mis penas y alegrías, aconsejándome y apoyándome.

A mi amiga Nicole por ser mi gran compañera de todos los días, porque junto a ella aprendí lo que es trabajar en equipo, apoyándonos y compartiendo nuestros logros y dificultades que nos tocó vivir, por todas las risas y momentos agradables que vivimos juntas y que hicieron entretenido este camino.

De manera especial agradezco a mis profesores, quienes más allá de entregarme conocimientos académicos, contribuyeron en mi formación personal. Dr. Esteban Rodríguez, gracias por brindarme su confianza, por orientarme, por compartir su sabiduría y por enseñarme a querer y disfrutar mi trabajo. Dra. Karin Vio, gracias por el permanente apoyo que me brindó, por su optimismo, por sus consejos y motivación, y particularmente por su amistad. Dra. Sara Rodríguez, agradezco su acogida en el laboratorio desde el primer instante, porque fue la primera persona con quien trabajé siendo ella mi primera guía para tomar este camino, gracias por su confianza y su cariño.

A la Dra. Montserrat Guerra, gracias por sus consejos y por colaborar en los métodos empleados.

A Don Genaro Alvial, por su admirable alegría de cada día, por su paciencia y colaboración.

A Paulina, Luis, Camilo, Guille, Clara, Paula, Fernando, Roberto, Mireya y Gabi, por ayudarme cada vez que lo necesite, por sus consejos, por la buena onda y los gratos momentos que compartimos.

Gracias a todos por su cariño y por haber sido parte de este importante proceso.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
1. RESUMEN	1
1.1 Summary	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Desarrollo del SNC	3
2.2 Neurogénesis postnatal de la ZSV	3
2.2.1 Nicho neurogénico de la ZSV	4
2.2.2 Corriente migratoria rostral (CMR)	7
2.2.3 Bulbo olfatorio	9
2.2.4 Factores que regulan la neurogénesis postnatal	9
2.3 Hidrocefalia: generalidades	11
2.4 Hidrocefalia en la rata H-Tx	12
2.5 LCR e hidrocefalia	14
2.6 Relación entre neurogénesis postnatal de la ZSV e hidrocefalia.	16
2.7 Hipótesis	18
2.8 Objetivos generales	18
3.9 Objetivos específicos	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Materiales	19
3.1.1. Reactivos	19

3.1.2. Material biológico	19
3.2. Métodos	20
3.2.1. Marcaje con Bromodeoxiuridina (BrdU)	20
3.2.2. Obtención de muestra de encéfalo posnatal en animales tratados con BrdU	21
3.2.3. Inmunocitoquímica	22
3.2.4. Inmunofluorescencia	23
3.2.5. Cuantificación de células BrdU positivas	25
3.2.6. Análisis estadístico	28
3.2.7. Adquisición de imágenes	28
4. RESULTADOS	29
4.1.Resultados capítulo I: Alteración en la distribución de las células proliferativas de la ZSV de los VL de la rata mutante H-Tx.	29
4.1.1. Análisis de la capacidad proliferativa de la ZSV de ratas H-Tx mediante un pulso de BrdU en ratas H-Tx PN7.	34
4.1.2. Cuantificación de células proliferativas en la Z1 y Z2 del ventrículo lateral de ratas H-Tx PN7 que recibieron marcaje con un pulso de BrdU.	38
4.1.3. Análisis de la capacidad proliferativa de la ZSV de ratas H-Tx mediante marcaje acumulativo de BrdU en ratas H-Tx PN30.	42
4.1.4. Cuantificación de células proliferativas de la Z1 y Z2 del ventrículo lateral en ratas H-Tx que recibieron marcaje acumulativo de BrdU en ratas PN7 y PN30.	45

4.1.5. Cuantificación de células proliferativas en la ZV del ventrículo lateral en ratas H-Tx PN7 y PN30 que recibieron marcaje acumulativo de BrdU.	57
4.2 Interpretación capítulo I: Alteración en la distribución de la actividad proliferativa de la ZSV de los ventrículos laterales en la rata mutante H-Tx.	60
4.3 Resultados capítulo II: Desorganización del nicho neurogénico postnatal de la ZSV en la rata H-Tx hidrocefálica.	64
4.3.1 Caracterización del nicho neurogénico mediante inmunofluorescencia doble BrdU/GFAP	64
4.3.2 Los astrocitos de la ZSV expresan Cx43	73
4.4 Interpretación capítulo II: Desorganización del nicho neurogénico postnatal de la ZSV en la rata H-Tx hidrocefálica.	76
4.5 Resultados Capítulo III: La corriente migratoria rostral se encuentra reducida y desorganizada en la rata H-Tx hidrocefálica.	81
4.5.1 Caracterización de la CMR mediante inmunohistoquímica	81
4.5.2 Estudio de la CMR mediante H/E en cortes sagitales de ratas H-Tx PN30.	86
4.5.3 Estudio preliminar de la CMR en el BO de ratas H-Tx PN30	88
4.6 Interpretación capítulo III: La corriente migratoria rostral se encuentra reducida y desorganizada en la rata H-Tx hidrocefálica.	92

5. DISCUSIÓN GENERAL	94
5.1 Las ratas H-Tx hidrocefálicas presentan una alteración de la neurogénesis postnatal que implica un cambio en la distribución de las células troncales neurales/progenitores neurales de la ZSV.	94
5.2. La hidrocefalia afecta la organización del nicho neurogénico de la ZSV.	97
5.3 La alteración de la CMR en la rata hidrocefálica, implica una menor llegada de neuroblastos al bulbo olfatorio.	99
6. CONCLUSIONES	103
7. BIBLIOGRAFÍA	104

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Detalle de anticuerpos utilizados en el estudio de neurogénesis postnatal de la ZSV.	24

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Organización del nicho neurogénico de la ZSV.	6
Figura 2. Migración de neuroblastos en la CMR hacia el bulbo olfatorio.	8
Figura 3. Esquema que muestra la división realizada para los análisis cuantitativos de las células BrdU + en los ventrículos laterales.	26
Figura 4. Sección frontal de encéfalo de ratas H-Tx PN7 teñidos con H/E	30
Figura 5. Sección frontal de encéfalo de ratas H-Tx PN30 teñidos con H/E	32
Figura 6. Análisis de la actividad proliferativa en la ZSV de un VL de ratas H-Tx PN7 mediante marcaje con pulso de bromodeoxiuridina (BrdU).	36
Figura 7. Análisis de la actividad proliferativa en la ZSV de la Z1 de los VL de ratas H-Tx PN7 mediante marcaje por pulso de BrdU.	39
Figura 8. Análisis de la actividad proliferativa en la ZSV de la Z2 de ratas H-Tx PN7 mediante marcaje por pulso de BrdU.	41
Figura 9. Análisis cuantitativo de las células proliferativas de la ZSV de un VL de ratas H-Tx PN30 mediante marcaje acumulativo de BrdU.	44
Figura 10. Análisis de la actividad proliferativa en la ZSV de la Z1 de ratas H-Tx PN7 mediante marcaje acumulativo de BrdU.	47
Figura 11. Análisis de la actividad proliferativa en la ZSV de la Z2 de ratas H-Tx PN7 mediante marcaje acumulativo de BrdU.	49
Figura 12. Análisis de la actividad proliferativa en la ZSV de la Z1 de ratas H-Tx PN30 mediante marcaje acumulativo de BrdU.	52

Figura 13. Análisis de la actividad proliferativa en la ZSV de la Z2 de ratas H-Tx PN30 mediante marcaje acumulativo de BrdU.	54
Figura 14. Análisis de la actividad proliferativa en la ZV del VL de ratas H-Tx PN7 y PN30 mediante marcaje acumulativo de BrdU.	59
Figura 15. La conformación de las cadenas migratorias y de los túneles de astrocitos está alterada en hidrocefalia.	66
Figura 16. Detalle de la conformación de las cadenas de neuroblastos y los túneles de astrocitos en la ZSV y CMR del VL.	69
Figura 17. El nicho neurogénico de la ZSV esta alterado en la rata H-Tx hidrocefálica.	71
Figura 18. Nódulos de células proliferativas (neuroblastos) a nivel de la Z2 de animales hidrocefálicos PN30.	73
Figura 19. Los astrocitos que forman los túneles por los que migran los neuroblastos en el nicho neurogénico que se encuentra en la ZSV de los ventrículos laterales expresan Cx43.	76
Figura 20. Detalle de la CMR de cortes frontales de encéfalo de ratas H-Tx normales PN30.	82
Figura 21. Detalle de la CMR de cortes frontales de encéfalo de ratas H-Tx hidrocefálicas PN30.	84
Figura 22. Corriente migratoria rostral en cortes sagitales de ratas H-Tx PN30 teñidos con H/E.	87
Figura 23. Bulbo olfatorio de ratas H-Tx.	89
Figura 24. Análisis cuantitativo de las células BrdU+ en el bulbo olfatorio.	90

Figura 25. Células proliferativas ubicadas en el espacio perivascular en la ZSV de la Z2 de los VL de una rata H-Tx hidrocefálica PN30 101

LISTADO DE ABREVIATURAS

AS	Acueducto de Silvio
ABC	Complejo abidina-biotina
BO	Bulbo olfatorio
BMP	proteína morfogénica ósea
BrdU	5'- Bromo-2'- desoxiuridina
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
CMR	Corriente migratoria rostral
Cx43	Proteína conexina 43
E	Embrionario
EGF	Factor de crecimiento epidermal
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
H-Tx	Hydrocephalus Texas rat
Hyh	Hydrocephalus with Hop Gait
IGF	Factor de crecimiento insulínico
LCR	Líquido céfaloaraquídeo
LCR-E	Líquido cefalorraquídeo embrionario
NPCs	Neural Precursors Cells (Células precursoras neurales)
NSCs	Neural Stem Cells (Células madre neurales)
OSC	Órgano subcomisural
PC	Plexos coroideos
PN	Postnatal

Shh	Sonic Hedgehog
SNC	Sistema nervioso central
TGF- α	Factor de crecimiento transformador alfa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VL	Ventrículo lateral
ZSV	Zona subventricular
ZV	Zona ventricular

1 RESUMEN

En el sistema nervioso embrionario las paredes del tubo neural están constituidas por una capa de células madre neurales (NSCs) conocida como zona ventricular (ZV). Las NSCs proliferan y originan los progenitores neurales (NPCs) que se ubican debajo de la ZV constituyendo la zona subventricular (ZSV). En las ZV y ZSV se originan todas las neuronas y células gliales que forman el SNC. En animales mutantes y en humanos que desarrollan hidrocefalia de inicio fetal existe una disrupción de las ZV y ZSV que gatilla el proceso hidrocefálico y alteraciones en la *neurogénesis prenatal*. Por ello, los animales mutantes y humanos hidrocefálicos nacen con un marcado déficit neurológico. Sin embargo, casi nada se sabe si las alteraciones ocurridas en la etapa embrionaria también afectan la *neurogénesis postnatal*, la cual en condiciones normales continúa en una zona discreta de la ZSV de los ventrículos laterales. El objetivo de la presente Tesis fue investigar si en la rata H-Tx hidrocefálica la neurogénesis postnatal está o no alterada. La proliferación de NSCs y NPCs y la migración de neuroblastos fueron investigadas administrando BrdU como pulso y casa ó en dosis acumulativa. Para la cuantificación de las células BrdU+ la ZSV fue dividida en *zona 1* (Z1), una región en forma triangular dorsal desde la cual es originada la corriente migratoria rostral (CMR); y en *zona 2* (Z2), una región ventral bajo el epéndimo de la pared latero-externa del ventrículo. El estudio del nicho y CMR se realizó por inmunofluorescencia doble BrdU/GFAP y BrdU/Cx43. Los hallazgos sustentan las siguientes conclusiones: (1) La proliferación de NPCs está drásticamente reducida en la Z1 e incrementada en la Z2; (2) el nicho neurogénico se encuentra desorganizado; (3) no existe migración de precursores proliferativos desde la Z2 a la Z1 y la CMR; (4) la migración de neurablastos por la CMR está alterada; (5) La proliferación de células en la ZV en ratas hidrocefálicas sugiere que NSCs continúan presentes en la capa endimaria o que hay células endimarias que proliferan.

1.1 SUMMARY

In the embryonic nervous system the neural tube walls are constituted by a layer of neural stem cells (NSCs) known as ventricular zone (VZ). NSCs proliferate and originate neural progenitors (NPCs) that are located below the VZ constituting the subventricular zone (SVZ). The VZ and SVZ originate virtually all neurons and glial cells that form the CNS. In mutant hydrocephalic animals and in humans with foetal onset hydrocephalus, a disruption of the VZ and SVZ triggers the hydrocephalic process and alterations in the *prenatal neurogenesis*. Thus, mutant animals and hydrocephalic humans are born with a marked neurological deficit. Very little is known whether the alterations occurring during the embryonic stage also affect the *postnatal neurogenesis* that under normal conditions occurs at a discrete region of the SVZ of the lateral ventricles. The aim of the present Thesis was to investigate whether in H-Tx hydrocephalic rats postnatal neurogenesis is altered. The proliferation of NSCs and NPCs and the migration neuroblasts along the rostral migratory stream (RMS) were investigated by administrating BrdU using a pulse and chase or cumulative protocols. For quantification of BrdU + cells the ZSV was divided into two zones: *zone 1* (Z1), a triangular shaped region located at dorsal most region of the latero-external wall of the ventricles and from which the RMS originates; *zone 2* (Z2), a ventral region of the latero-external wall of the ventricles. The neurogenic niche and the RMS were studied by double immunofluorescence for BrdU / GFAP and BrdU/Cx43. The findings led to the following conclusions: (1) Proliferation of precursor cells is drastically reduced in Z1 and increased in Z2; (2) the neurogenic niche is disrupted; (3) Migration of proliferative precursors from Z2 to Z1 and to the RMS is impaired; (4) Migration of neuroblasts along the RMS is altered; (5) Proliferation of cells in the VZ (ependyma) of hydrocephalic rats suggests that NSCs continued to be present in the ependymal lining or, alternatively, that there are proliferative ependymal cells.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Desarrollo del SNC

A medida que se desarrolla el embrión, el tubo neural sufre una serie gradual y controlada de constricciones y dilataciones selectivas que darán origen a las distintas regiones del cerebro y de la medula espinal. El lumen central o cavidad neural corresponde al sistema ventricular embrionario (Gilbert, 2000). Este sistema ventricular está lleno de líquido cefalorraquídeo (LCR) y revestido por células neuroepiteliales en el período fetal y endoteliales en el período adulto (Miyazaki *et al.*, 2003). La corteza cerebral se origina mediante un proceso de proliferación y diferenciación de neuronas y glías a partir de la zona ventricular (ZV) (neuroepitelio) y subventricular (ZSV). Desde aquí los neuroblastos migran a través de la glía radial hacia la placa cortical (Miyazaki *et al.*, 2003). La ZSV es una importante capa germinal que se forma durante el desarrollo, adyacente a la ZV telencefálica, siendo muy prominente en la región ventral de los ventrículos laterales (VL) donde constituyen las eminencias ganglionares medial y lateral (Doetsch *et al.*, 1997). En la ZV del embrión, la glía radial mantiene contacto con la superficie pial y la superficie ventricular. Poco después del nacimiento, la glía radial se transforma en astrocitos parenquimales y una subpoblación de la glía radial se transforma en células endoteliales inmaduras que reemplazan progresivamente al neuroepitelio y se diferencian finalmente en epéndimo multiciliado maduro (Voigt, 1989).

2.2 Neurogénesis postnatal de la ZSV

En el cerebro maduro, la neurogénesis continúa en una región circunscrita a la pared externa de los VL, que corresponde a la ZSV (Tramontin *et al.*, 2003). Esta región germinal, es un manto de células que se extiende recubriendo las paredes laterales de los VL. Las células que nacen a lo

largo de la ZSV se agrupan en un cordón de neuroblastos migratorios que forman la corriente de migración rostral (CMR), que une la ZSV con el bulbo olfatorio (BO). En el BO los neuroblastos se diferencian en dos tipos de neuronas inhibitorias, las granulares y las periglomerulares (Chojnacki *et al.*, 2009). La neurogénesis postnatal de la ZSV consta de tres etapas: proliferación, migración y diferenciación (Abrous *et al.*, 2005). Los neuroblastos (células A) migran a lo largo de una red compleja de astrocitos formando la CMR hacia el BO (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996) donde se diferencian en interneuronas las cuales son importantes para la discriminación olfativa y memoria en roedores (Chojnacki *et al.*, 2009).

2.2.1 Nicho neurogénico de la ZSV

A nivel de la ZSV las células madre multipotentes que sostienen la autorenovación se organizarían en una estructura denominada “nicho neurogénico”.

Estudios mediante microscopía electrónica de la pared de los VL han revelado que la organización del nicho de la ZSV se basa en cuatro principales tipos celulares: células endimarias, astrocitos de la ZSV (células B), células progenitoras amplificadores transitorios (células C) y neuroblastos (células A) (Doetsch *et al.*, 1997).

Las células A (neuroblastos), migran en cadena de células homólogas, a través de un túnel formado por astrocitos. Los astrocitos que rodean directamente a las células tipo A (células B1) presentarían propiedades de células madres, con una prolongación que llega al lumen ventricular y un cilio único (parecido a la glía radial en el período embrionario) que tendría las característica de un cilio sensor (Doetsch *et al.*, 1999; Chojnacki *et al.*, 2009). En roedores se ha visto que estas

células B1 también presentarían una larga prolongación basal que alcanzaría vasos sanguíneos (Mizadeh *et al.*, 2008) (**Figura 1**). Formando parte de este nicho también se observan racimos de células de división rápida (células C), por otra parte, la ZSV está separada del ventrículo por una capa de células ependimarias ciliadas. La secuencia sería, los astrocitos subventriculares (células B1), con propiedades de célula troncal se autorregenerarían, y darían origen a las células C que se dividen para dar las células A (neuroblastos) migratorias (Doetsch *et al.*, 1997) (**Figura 1**)

Otra notable característica de esta región es una especializada lámina basal la cual se extiende desde los vasos sanguíneos en la ZSV y termina en pequeños bulbos adyacentes a las células ependimarias y contacta con todos los tipos celulares de la ZSV (Doetsch, 2003).

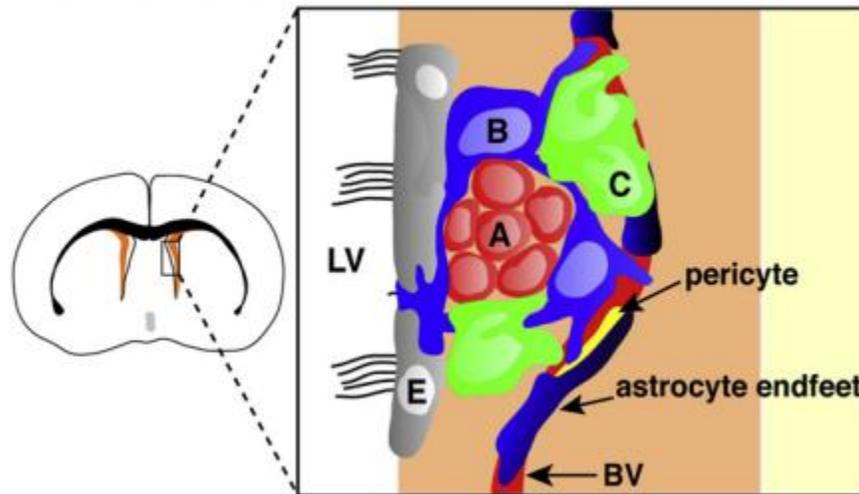


Figura 1. Organización del nicho neurogénico de la ZSV (Tavazoie *et al.*, 2008). El dibujo de la izquierda es una sección frontal del cerebro anterior de roedor donde se muestra la localización de la ZSV en la pared latero-externa del VL. A la derecha se muestran los tipos celulares y la organización de la ZSV. Cadenas de neuroblastos (células A, en rojo) están rodeadas por células tipo B (astrocitos, en azul) que forman estructuras tubulares. Grupos de células C, altamente proliferativas (células progenitoras, en verde) están asociadas con las cadenas de células A. Las células endimarias (E) forman una lámina continua de células que separa a la ZSV del VL. Vasos sanguíneos (BV) son un componente integral del nicho neurogénico de la ZSV. Células B y C están en contacto con la vasculatura en las regiones en que los vasos sanguíneos carecen de “pies de astrocitos” (azul oscuro) y cobertura de pericitos dando acceso directo a las señales que provienen de la sangre. Las células B generan a las células C, las que finalmente generan a las células A. (Tavazoie *et al.*, 2008)

2.2.2 Corriente migratoria rostral (CMR)

Tal vez una de las formas más complejas de migración de gran alcance ocurre en el cerebro adulto: neuroblastos nacen en la ZSV y migran rostralmente al BO y ahí se diferencian en interneuronas locales (Sawamoto *et al.*, 2006). En roedores las neuronas jóvenes primero migran en la ZSV donde ellas forman redes de cadenas interconectadas de neuroblastos que se unen a la CMR que las conduce hacia el centro del BO.

Dentro de la CMR neuroblastos (células A) con forma elongada son agregados en cadenas y (Gritti *et al.*, 2002) a través de túneles de astrocitos (células B) (Lois, 1996). (**Figura 2**). Dada las grandes distancias que las células A recorren a través de diferentes ambientes locales la vaina glial proporcionaría soporte trófico para la migración de estas células, las aislaría de la influencia química y eléctrica del parénquima circundante (Doetsch, 1997). Estudios muestran que los astrocitos que participan en el CMR se encontrarían acoplados a través de *gap junctions*, lo que les permitiría proporcionar una rápida propagación de las señales dentro del nicho de la ZSV (Doetsch *et al.*, 2003)

La CMR es un tipo de migración tangencial que es independiente de la glía radial (Marin y Rubenstein, 2003). Algunos de los factores que guían a los neuroblastos hacia el BO corresponderían a quimiorepelentes presentes en el LCR (miembros de la familia Slit) y a un flujo direccional del LCR, que forma un gradiente de concentración de moléculas de orientación. Este flujo depende de un correcto batido ciliar del epéndimo (Sawamoto *et al.*, 2006).

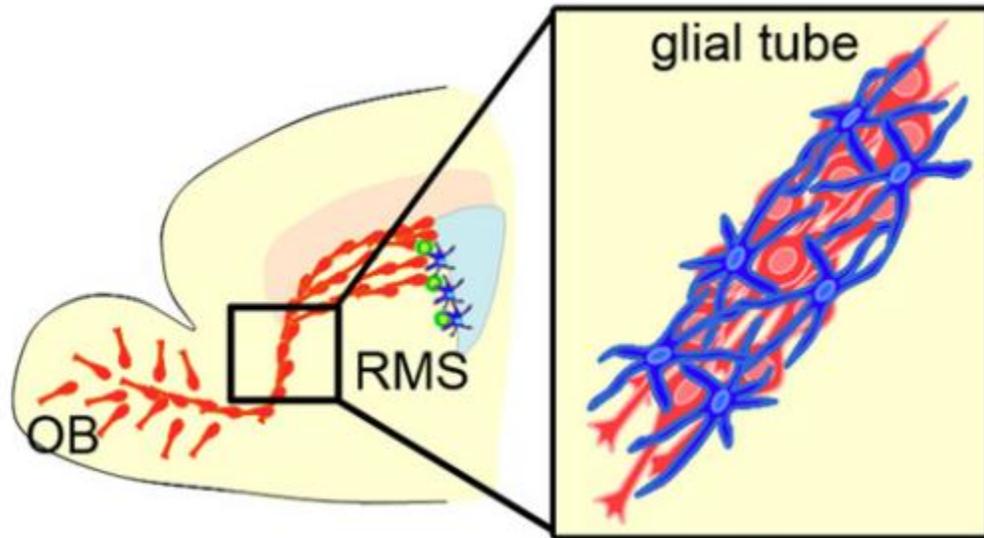


Figura 2. Migración de neuroblastos en la CMR hacia el bulbo olfatorio. Nuevos neuroblastos se generan en la ZSV y migran hacia el BO a través de la CMR. Los neuroblastos (en rojo) forman cadenas de migración las cuales se encuentran rodeadas por una vaina de astrocytes (en azul) conocida como tubo o túneles gliales. (Kaneko y Sawamoto, 2009)

2.2.3 Bulbo olfatorio

Los neuroblastos al alcanzar el centro del BO se mueven radialmente hacia las capas granular y periglomerular y se diferencian en interneuronas maduras esenciales para la percepción olfativa (Gritti *et al.*, 2002). El número de células que alcanza el BO diariamente es de 10.000 a 30.000 y se diferenciarían en células granulares y periglomerulares en una razón de 3:1 (Luskin 1993; Lois y Alvarez-Buylla 1994). La continua generación de nuevas neuronas en el BO, con la finalidad de mantener el número total de células, surge en respuesta a una permanente pérdida de células. Muerte celular programada se ha mostrado como una característica regulatoria prominente en las regiones neurogénicas del BO. (Bielbl *et al.*, 2000). Aproximadamente un 50- 70% de las nuevas neuronas dentro de la capa celular granular muere el día 40-45 después del nacimiento neuronal. Luego de este período el recambio de nuevas neuronas disminuye, sugiriendo que parte de la población de nuevas neuronas es integrada de forma permanente en el circuito funcional del BO (Bagley *et al.*, 2007).

2.2.4 Factores que regulan la neurogénesis postnatal

Las señales del microambiente y las interacciones célula – célula son críticas para el mantenimiento del nicho de las células madre neurales. El fenómeno de neurogénesis postnatal depende en gran medida de la presencia de un nicho neurogénico, en el cual participan diferentes factores y tipos celulares. Dentro de estas últimas las células endimarias parecen desempeñar un rol importante (Lim *et al.*, 2000). Los endimocitos secretan **noggin** una proteína que bloquea la acción de la proteína morfogénica ósea (BMP) en el nicho ZSV, generando un ambiente que favorece la neurogénesis por sobre la gliogénesis. Por otra parte, el factor derivado del epitelio pigmentario secretado por las células endimarias, específicamente estimula a las

células B de la ZSV para mantener el pool de células madre neurales no diferenciadas en el nicho neurogénico (Ramirez Castillejo, 2006). El microambiente molecular del nicho neurogénico también es influenciado por la composición del LCR. El LCR contiene varios componentes que participan en el proceso neurogénico, por ejemplo el factor neurotrófico ciliar y el factor inhibitorio de leucemia que juegan un papel importante en promover la actividad proliferativa y en mantener los progenitores neurales indiferenciados (Jiménez *et al.*, 2009).

Se ha determinado que la señalización mediada por diversos factores de crecimiento actúa en diferentes estados del linaje de las células madre neurales. Observándose que el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento transformador alfa (TGF- α), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) afectan la capacidad proliferativa en las regiones neurogénicas del cerebro adulto. Además las señalizaciones generadas de Eph/Ephrin, Shh, prolactina, hormonas adrenales y el ejercicio, también tienen efecto sobre la neurogénesis. Sin embargo, la forma en cómo actúan en cada célula del nicho neurogénico es desconocido (Doetsch *et al.*, 2003). Estudios *in vitro* muestran que el EGF y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2) son factores importantes para el mantenimiento de las células madre neurales adultas. *In vivo*, ambos factores promueven proliferación en la ZSV, pero solo FGF2 incrementa el número de nuevas neuronas en el BO (Zhao *et al.*, 2008).

Otro fenómeno importante que afecta la neurogénesis de la ZSV, lo constituyen las interacciones célula-célula que son abundantes en las regiones neurogénicas del cerebro adulto, contribuyendo en la mantención, activación y diferenciación de las NSCs a través de señalización y determinando el modo de división celular (simétrica, asimétrica).

La lámina basal especializada y los componentes de la matriz extracelular en la ZSV adulta forma una parte importante del nicho. (Doetsch *et al.*, 2003).

2.3 Hidrocefalia: generalidades

La hidrocefalia es una alteración del SNC etiológicamente heterogénea; se caracteriza por una acumulación del LCR en el sistema ventricular debido a un desbalance entre la producción y su reabsorción o a un obstáculo en su circulación (Jones *et al.*, 1987; Oi and Di Rocco, 2006).

La incidencia en humanos es aproximadamente 1 a 3 por cada mil nacidos vivos (Jiménez *et al.*, 2001). La hidrocefalia se puede clasificar en comunicantes y no comunicantes (Dandy, 1919). En la comunicante la causa de la acumulación del LCR se encuentra generalmente a nivel de las vellosidades aracnoideas (alteración en la absorción) o en anomalías del drenaje linfático. Mientras que en la no-comunicante la causa de la alteración en el flujo del LCR se encuentra dentro del sistema ventricular. La causa principal de obstrucción en el flujo del LCR es la estenosis del Acueducto de Silvio (AS).

La hidrocefalia congénita representa una de las condiciones neuropatológicas más frecuentes en la pediatría (Bruni y Del Bigio, 1997). Entre el 70 a 80% de ellas son por estenosis y/u obliteración del acueducto cerebral (Jones *et al.*, 2000).

En los últimos años estudios realizados en la cepa de ratones mutantes *hyh* (*hydrocephalus with hop gait*), que desarrollan hidrocefalia congénita, han mostrado que la estenosis del AS es producto del denudamiento neuroepitelio/epéndimo de la ZV, que sigue patrones espaciales y temporales determinados (Páez *et al.*, 2007; Jiménez *et al.*, 2001). Este denudamiento tendría un

inicio temprano durante el desarrollo (E12) y se iniciaría a nivel del epéndimo ventral del IV ventrículo, progresando caudalmente al canal central de la médula espinal y rostralmente al epéndimo ventral del AS y III ventrículo (Jiménez *et al.*, 2001). En el caso del ratón mutante *hyh* la disrupción de la ZV del AS resulta en (i) un aumento del flujo en masa desde el tejido nervioso hacia las cavidades ventriculares (Jiménez 2001), (ii) alteraciones en la dinámica del flujo del LCR, (iii) la aproximación y fusión de las neurópilas denudadas en el AS y finalmente, hidrocefalia (Wagner *et al.*, 2003). La disrupción de la ZV que ocurre en el telecefálo del ratón *hyh* durante la vida fetal conduce a la pérdida de la glía radial/células stem y a la desorganización de la ZSV, lo cual resulta en una alteración del proceso neurogénico. Estos hallazgos han llevado a proponer que la hidrocefalia y una alteración en la neurogénesis tienen una etiología común (Rodríguez *et al.*, 2012).

2.4 Hidrocefalia en la rata H-Tx

La rata de la cepa H-Tx, es la única rata que desarrolla hidrocefalia hereditaria, la cual comienza a partir del E18 de la vida fetal e involucra la estenosis del AS. Estas ratas desarrollan una hidrocefalia severa, no sobreviviendo más de las 4-6 semanas de edad (Kiefer *et al.*, 1998). Entre E18 y E19 ocurre la estenosis del AS, producto del mal desarrollo del tercio medio caudal del órgano subcomisural (OSC) (Ortloff, 2008). Bajo condiciones normales este órgano secreta activamente glicoproteínas de alto peso molecular y altamente sialiladas hacia la cavidad del tercer ventrículo. Diferentes investigaciones proponen que el mal desarrollo del OSC y alteraciones de su actividad secretoria anteceden y conllevan al desarrollo de hidrocefalia. La alta carga negativa de las glicoproteínas secretadas por el OSC concedería una alta carga negativa lo

que provocaría un efecto repulsivo entre las paredes de regiones tan estrechas como el AS. La alteración del OSC también ha sido observada en el ratón *hyh*, fenómeno que antecede al desarrollo de hidrocefalia en este animal (Wagner *et al.* 2003; Ortloff, 2008). Una vez que ocurre la estenosis del AS, comienza una rápida dilatación de los VL. En este mismo período, el neuroepitelio del techo de los VL comienza a desorganizarse y a denudarse. A medida que ocurre este fenómeno, la superficie ventricular y ZSV se ve infiltrada por un gran número de macrófagos ventriculares. Los macrófagos no se distribuyen al azar en el ventrículo dilatado, sino que sobre las células de la ZV alterada (Ortloff, 2008). En esta rata el denudamiento de la ZV en el telencéfalo sigue un patrón excepcional: se inicia como un foco pequeño de disrupción que progresa radialmente, convirtiéndose en un foco redondo grande de ZV desorganizada; varios focos en diferentes estados de progresión de la disrupción coexisten, constituyendo un buen modelo de estudio de la enfermedad. A través de cada uno de los focos de denudamiento, las células precursoras neurales de la ZSV protruyen al ventrículo (Ortloff, 2008). En E19 la superficie dorsal de los VL está recubierta completamente por NSCs por lo que una pérdida de la ZV implica pérdida de NSCs (Ortloff, 2008, Lichtin, 2012)

En los fetos de rata H-Tx hidrocefálicos hay una disminución de la neurogénesis, lo que resulta en un adelgazamiento de la corteza cerebral y una alteración de la estratificación de las neuronas (Mashayekhi *et al.*, 2002)

2.5 LCR e hidrocefalia

El sistema ventricular está revestido por células neuroepiteliales y endoteliales en el período fetal y adulto respectivamente. Este sistema comprende cuatro cavidades ventriculares y por el circula el LCR (Miyan *et al.*, 2003).

El LCR ha sido reconocido como un componente clave del sistema homeostático del cerebro y un modulador fisiológico de la función cerebral, tanto en etapas tempranas del desarrollo como en la etapa adulta (Mashayekhi *et al.*, 2002; Miyan *et al.*, 2003). En la vida postnatal, cerca del 70-80 % del LCR es producido por los plexos coroideos ubicados en los VL, tercero y cuarto. El porcentaje restante lo produce otras fuentes que intercambian continuamente líquido y sus componentes desde y hacia el lumen ventricular: el parénquima cerebral a través del neuroepitelio y epéndimo ventricular, capilares de la piamadre y aracnoides (Miyan *et al.*, 2003). La formación de LCR se da por una activa secreción por células coroidales, que involucra bombas, cotransportadores y antitransportadores, canales iónicos y acuaporinas. Este proceso está sometido a modulación neuroendocrina y hormonal (Johanson *et al.*, 2007).

El flujo del LCR ocurre en dirección rostro-caudal a través del sistema ventricular y comienza desde los VL, bañando el epitelio germinal de la corteza cerebral, y pasa hacia el tercer ventrículo a través del foramen de Monro y desde aquí al cuarto ventrículo por el AS. La circulación del LCR se externaliza, pasando desde el cuarto ventrículo hacia la cisterna Magna para después seguir hacia el espacio subaracnoideo, donde una parte del LCR asciende por sobre los hemisferios cerebrales y otra baña la médula espinal. Finalmente el LCR es reabsorbido a través del seno sagital superior, linfáticos nasales, por mecanismos que incluyen acuaporinas y las bombas de sodio-potasio ATPasa. (Mashayekhi *et al.*, 2002; Miyan *et al.*, 2003).

Aunque el LCR ha sido estudiado históricamente en el contexto del cerebro adulto, siendo asociado, como se mencionó, con funciones mecánicas y funciones fisiológicas complejas, está cada vez más claro que el LCR tiene un rol fisiológico fundamental tanto en el período embrionario como en el postnatal. (Owen-Lynch *et al*, 2003; Mashayekhi *et al*, 2002; Miyan *et al*, 2001 ; Rodriguez *et al.*, 2010)

La fracción proteica del LCR, durante la etapa embrionaria, es mucho más compleja y tiene una concentración mayor que en el LCR adulto, lo que ha conducido a algunos investigadores a sugerir que el LCR embrionario (LCR-E) está involucrado en la regulación del comportamiento de las NSCs (Dziegielewska *et al.*, 2000; Miyan *et al.*, 2003; Gato *et al.*, 2004). En numerosas publicaciones se ha sugerido que el neuroepitelio presenta un comportamiento autónomo, el cual sería realizado por secreción autocrina y/o paracrina de moléculas difusibles (Vaccarino *et al*, 1999). Sin embargo, estos factores no son capaces por si solos de mantener la supervivencia, proliferación y neurogénesis de las células madre neuroectodermales, sino que requieren de factores tróficos exógenos aportados desde el LCR embrionario (Gato *et al*, 2005).

La importancia del LCR durante el desarrollo del SNC queda de manifiesto cuando existe alguna anomalía en el flujo del LCR, como pérdida (espina bífida) o bloqueo (hidrocefalia) de su circulación, donde estas alteraciones se ven asociadas a anomalías en el desarrollo del SNC, en particular de la corteza cerebral (Miyan *et al*, 2001; 2003).

Estudios indican que las alteraciones en la composición del LCR hidrocefálico podrían interferir en el proceso neurogénico y gliogénico durante el desarrollo del cerebro fetal (Johanson y Jones, 2001; Mashayekhi *et al.*, 2002). Análisis de la proteómica del LCR de la rata H-Tx realizado en

nuestro laboratorio, muestran cambios en la composición proteica entre ratas normales e hidrocefálicas (Jaramillo, 2009).

Estudios realizados en rata mutante H-Tx, han establecido un deterioro en el desarrollo de su corteza cerebral. Tal defecto en el desarrollo de fetos hidrocefálicos, aparece después de que el flujo del LCR es obstruido en el día E18 (Mashayekhi *et al*, 2002).

2.6 Relación entre neurogénesis postnatal de la ZSV e hidrocefalia.

La organización de las células madre en el nicho de la ZSV es fundamental para la neurogénesis postnatal, permitiendo que las NSCs (células B1): (i) mantengan el contacto con el LCR (ii) compartan complejos de unión apicales (uniones adherentes y en hendidura) entre sí y con células endimarias, lo cual es esencial para las divisiones simétricas y asimétricas, y (iii) estar expuestas a señales apicales que en gran medida derivan de las células endimarias (Chenn and Walsh, 2002). Por lo tanto, las células endimarias son un componente clave para el nicho neurogénico de la ZSV postnatal. Animales y probablemente humanos nacidos con una disrupción de la ZV, carecen del componente endimario del nicho neurogénico (Del Bigio, 2001; Jiménez *et al.*, 2009).

Como se señaló anteriormente, el ratón mutante *hyh*, presenta un programa de denudamiento de la ZV que sigue patrones espaciales y temporales definidos (Páez *et al.*, 2007; Jiménez *et al.*, 2001). Este programa incluye las paredes de los VL y, en particular lo que en adulto será la ZSV, por lo que una alteración en la neurogénesis postnatal de estos ratones es previsible. Efectivamente estudios realizados en esta cepa de ratones mostró: (i) una desorganización del nicho de la ZSV, (ii) una marcada reducción de células proliferativas en la ZSV, (iii) una migración anómala de neuroblastos hacia la cavidad ventricular y, (iv) una drástica reducción en

la migración de neuroblastos a través de la CMR. En este estudio se concluyó que en este modelo de hidrocefalia existen alteraciones en la neurogénesis postnatal causados por la disrupción de la ZV del nicho neurogénico (Jiménez *et al.*, 2009).

Las células troncales de la ZSV presentan una prolongación que atraviesa la capa endimaria que termina en el lumen del VL, donde proyecta un cilio 9+0, lo que ha sido interpretado como una organización de la célula troncal para recibir estímulos provenientes del LCR (Doetsch, 1997). Por otra parte, se ha demostrado que la dirección de la migración de los neuroblastos en la ZSV se correlaciona con el flujo del LCR y que este flujo es necesario para su correcta orientación hacia el BO (Sawamoto *et al.*, 2006) lo cual constituye una evidencia que las células de la ZSV pueden responder *in vivo* a señales del LCR. Según Mashayekhi (2002), el LCR puede contener factores que estimulan la proliferación y diferenciación celular, compuestos inhibitorios y otras “señales” requeridas para una normal actividad de la capa germinal del cerebro en desarrollo; de esta forma la acumulación o desequilibrio de estos compuestos puede inhibir la actividad proliferativa y/o alterar el destino de las células progenitoras.

Considerando los antecedentes antes expuestos que muestran i) que la disrupción de la ZV cuando ocurre en el AS gatilla su estenosis e hidrocefalia, y cuando ocurre en el telencéfalo implica pérdida de NSCs y, consecuentemente, alteraciones en la neurogénesis, ii) que la composición proteica y flujo del LCR de la rata H-Tx está alterado, iii) que normalmente factores presentes en el LCR participan en la regulación de la proliferación de las NSCs y NPCs, y iv) que el flujo del LCR es importante para la migración de los neuroblastos. Nos planteamos la siguiente hipótesis:

2.7 Hipótesis

En la rata H-Tx la neurogénesis postnatal de la ZSV está alterada.

2.8 Objetivo general

Investigar en la rata mutante H-Tx hidrocefálica probables alteraciones en la neurogénesis postnatal.

2.9 Objetivos específicos

1. Analizar en la ZSV de ratas H-Tx normales e hidrocefálicas la proliferación de los progenitores neurales.
2. Analizar la organización del nicho neurogénico de la ZSV de ratas H-Tx normales e hidrocefálicas.
3. Analizar la corriente migratoria rostral en ratas H-Tx normales e hidrocefálicas.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos

De Sigma Chemical Co. se adquirieron los siguientes reactivos: Tritón X-100 (X-100), lamda-carragenano (C-3889), gelatina, 3-3-diaminobenzidina (D-5637), anti-IgG de rata, tetróxido de osmio (75632). LAB. Biosano S.A. se adquirió el siguiente reactivo: Heparina Sódica.

En Merck Química Chilena se adquirieron los siguientes reactivos: Cloruro de sodio, etanol, metanol, peróxido de hidrógeno, fosfato de sodio, acetona, glutaraldehído.

El kit abidina biotina para inmunohistoquímica se adquirió de Dako (K0690). Alcoholes utilizados en la técnica histológica se adquirieron en Winkler Ltda. y la parafina (PARAPLASTTM) en Monoject Scientific.

Los anticuerpos secundarios para inmunofluorescencia se adquirieron de INVITROGEN.

3.1.2 Material biológico

Ratas mutantes H-Tx de 7 y 30 días postnatales (PN7 y PN30) de la colonia del Instituto de Anatomía, Histología y Patología de la Universidad Austral de Chile. Las ratas son mantenidas mediante la cruce entre hermanos fenotípicamente normales, obteniéndose una incidencia de crías con el fenotipo hidrocefálico de alrededor 30-40%. En el bioterio de este Instituto, son mantenidas bajo régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con alimentación y bebida *ad libitum* a base de pellet para roedores y agua potable. La temperatura se mantiene constante a

25°C. Para todos los experimentos se utilizaron ratas H-Tx hidrocefálicas para el estudio y ratas H-Tx normales de la misma camada como control.

3.2 Métodos

3.2.1 Marcaje con Bromodeoxiuridina (BrdU)

Para marcar células en proliferación en el cerebro de ratones postnatales se utilizó 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina que se incorpora al DNA de las células en división durante la fase S del ciclo celular.

La BrdU fué administrada mediante inyección intraperitoneal en ratas H-Tx PN7 y PN30 (hidrocefálicas y controles) a una dosis de 100mg/Kg. Se realizaron dos protocolos de inyección: A) *Marcaje por pulso* que consiste en la inyección de una sola dosis de BrdU (10 A.M), siendo las ratas sacrificadas 1 hora después de la inyección. Este protocolo permite identificar las células que se encuentran en división en ese momento. Se inyectaron ratas PN7 y PN30 con este protocolo, pero sólo se procesaron las muestras de ratas PN7. B) *Marcaje acumulativo* que comprende la inyección de 3 dosis diarias durante 3 días (8, 12 y 16 hrs.), siendo sacrificadas las ratas una hora después de la última inyección. Este protocolo permite hacer un seguimiento de la actividad proliferativa y evaluar migración de los neuroblastos desde la ZSV. Este protocolo fue aplicado en ratas PN7 y PN30. Inmediatamente después del sacrificio las ratas se procesaron histológicamente para inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo primario anti-BrdU. Para cuantificar el número de células BrdU (+) en ratas hidrocefálicas y sus correspondientes hermanos no hidrocefálicos, se examinaron cortes coronales comparables.

3.2.2 Obtención de muestras de encéfalo postnatal en animales tratados con BrdU

Para analizar la ZSV de ratas H-Tx, se utilizaron en total 26 ratas para estudios de proliferación y migración: 8 ratas normales y 8 ratas hidrocefálicas PN7, y 4 ratas normales y 4 hidrocefálicas PN30 para cortes coronales y 1 rata control y 1 hidrocefálica para cortes sagitales de cada edad.

Estas ratas fueron clasificadas como normales o hidrocefálicas mediante observación clínica, siendo clasificadas como hidrocefálicas las ratas que presentaron la cabeza en forma de domo y confirmada por la técnica de transiluminación.

En el día del sacrificio los animales fueron anestesiados y perfundidos vascularmente con solución salina y luego con fijador Bouin. Los cerebros fueron procesados y mantenidos en Bouin durante 2 días. Los cerebros se procesaron para obtener cortes frontales y sagitales. El telencéfalo se monto para obtener cortes frontales de los VL y sagitales para ver la corriente de migración rostral hacia el bulbo olfatorio. Posteriormente las muestras se deshidrataron en una batería de alcoholes de concentración creciente y se incluyeron en Paraplast. Cortes de 8 micras de espesor se procesaron para estudios con Hematoxilina y Eosina (H/E) e inmunocitoquímica.

3.2.3 Inmunocitoquímica

Los cortes se inmunotñieron mediante tres procedimientos: el método peroxidasa-antiperoxidasa de Sternberger y col. (1970), el método del complejo abidina-biotina (ABC) e inmunocitoquímica indirecta utilizando segundos anticuerpos marcado con fluorocromos (inmunofluorescencia).

Exposición de antígenos.

Una vez que los cortes estuvieron desparafinados e hidratados (previo a la incubación con el anticuerpo primario), se incubaron en buffer citrato 0,02M pH 6,0 y se trataron en microondas a 90°C, procedimiento repetido tres veces, durante 4 minutos cada repetición. Esto se llevo a cabo para el siguiente anticuerpo primario: GFAP

Para la inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-BrdU los cortes desparafinados e hidratados fueron incubados previamente con HCl 1M en la estufa a 45°C durante 30 minutos.

Método ABC: los cortes desparafinados e hidratados fueron incubados con el primer anticuerpo durante 13 horas en cámara húmeda. Posterior a la incubación con el anticuerpo primario, los cortes se lavaron en Buffer Tris-HCl pH 7.4 y se incubaron por 30 minutos con una mezcla de anticuerpos secundarios (anti-IgG de conejo, cabra y ratón) biotinilados, y luego se incubaron 30 minutos con el complejo avidina peroxidasa (Kit Dako). Finalmente la reacción de la peroxidasa se visualizó incubando los cortes en 3,3'-diaminobenzidina (DAB) en oscuridad durante 15 minutos (0,2% DAB en Tris-HCl y 0,007% peróxido de hidrógeno). Posterior al procedimiento inmunocitoquímico, las secciones se analizaron mediante el uso de microscopio de campo claro.

3.2.4 Inmunofluorescencia

Los cortes desparafinados e hidratados fueron incubados con el primer anticuerpo durante 13 horas. Las secciones se lavaron en buffer Tris-HCl pH 7,4 y se incubaron por 30 minutos en el anticuerpo secundario 1:500 (Invitrogen) correspondiente, conjugado con un fluoróforo Alexa Fluor 488 anti-conejo o Alexa Fluor 594 anti-ratón (Invitrogen). Para la inmunofluorescencia doble se incubó con una mezcla de los anticuerpos primarios (**Tabla I**) en las diluciones requeridas para cada anticuerpo y luego se incubó también con una mezcla de anticuerpos secundarios 1:500 (Invitrogen) ambos conjugado con su fluoróforo correspondiente y realizados en especies diferentes según el primer anticuerpo. Posteriormente, los cortes fueron montados en medio para fluorescencia (S3023, Dako).

Como control de la inmunorreacción, en algunos cortes se omitió la incubación con el primer anticuerpo.

Tabla I. Detalle de anticuerpos utilizados en el estudio de neurogénesis postnatal de la ZSV.

Anticuerpo	Antígeno	Especie	Dilución
Anti-BrdU (Banco de Hibridoma)	Bromodeoxiuridina. Análogo de la timidina que se incorpora al ADN en la fase S del ciclo celular. Marcador de proliferación celular.	Ratón	1:100
Anti-GFAP (Dako)	Proteína acídica fibrilar glial, un filamento intermedio. Marcador de astrocitos.	Conejo	1:500
Anti-Cx 43 (Aportado por Dr. Juan Carlos Sáez)	Conexina 43. Proteína de unión celular en hendidura	Conejo	1:750

3.2.5 Cuantificación de células BrdU positivas

A partir de inmunocitoquímicas anti- BrdU realizadas en seriados (1 cada 20) de la zona de neurogénesis postnatal se escogieron para la cuantificación 4 cortes frontales por condición considerando estructuras del cerebro como puntos de referencia. Se tomó registro fotográfico de los 4 cortes y se procedió a cuantificar las células inmunoreactivas para BrdU utilizando el programa *ImageJ*. La cuantificación de los núcleos inmunoreactivos se realizó sin considerar el tamaño, forma e intensidad de la tinción.

Para la cuantificación la pared ventricular fue dividida en 2 zonas: Zona 1 (Z1), correspondiente a la región triangular dorsal desde la cual se origina la CMR de neuroblastos; y zona 2 (Z2), región de la pared latero-ventral del VL (**Figura 3**). También se realizó una cuantificación total, es decir la sumatoria de la Z1 y Z2. Los valores se presentan como el promedio de los valores obtenidos en 4 animales por condición.

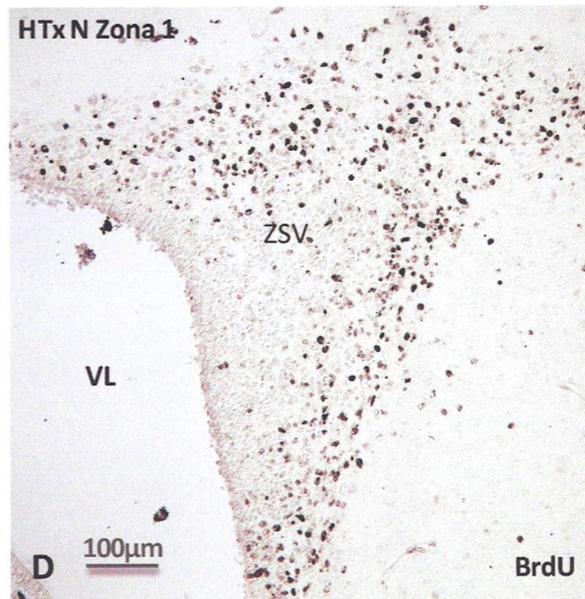
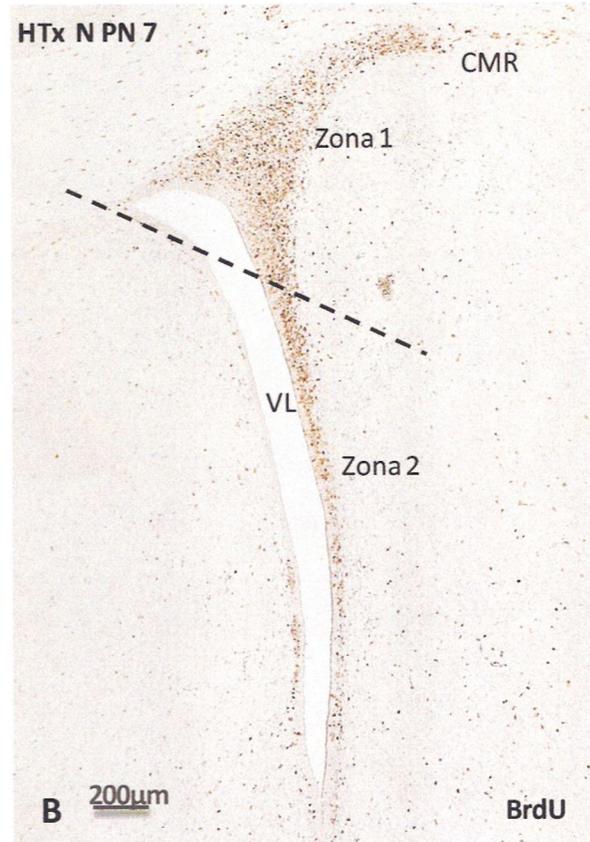
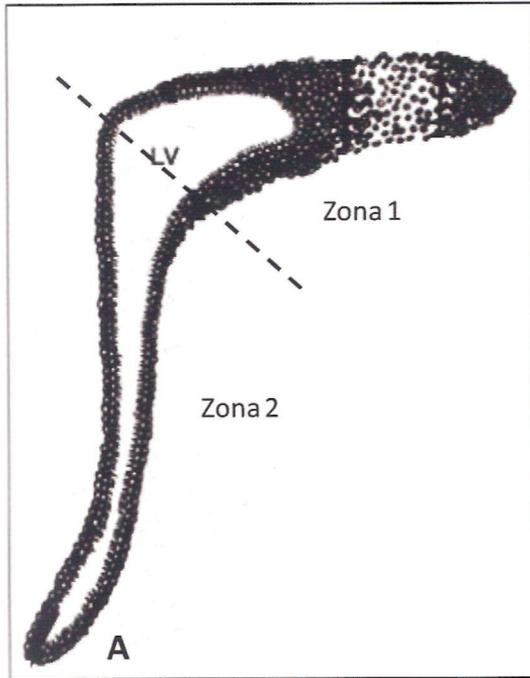


Figura 3. Esquema que muestra la división realizada para los análisis cuantitativos de las células BrdU + en los ventrículos laterales. A: Dibujo que muestra la organización de la ZSV en el VL (adaptado de Brazel *et al.*, 2003), el cual fue dividido en dos zonas: zona 1 (Z1) correspondiente a la región dorso-lateral del VL desde donde se origina la CMR y zona 2 (Z2) que corresponde a la pared latero-ventral del VL. **B:** Corte frontal que muestra el VL de una rata H-Tx normal PN7. Inmunocitoquímica anti-BrdU. Se observan células inmunorreactivas para el anticuerpo anti-BrdU. Imagen para ejemplificar la división en Z1 y Z2 para el análisis cuantitativo de la ZSV. **C:** Detalle de la Z2 de un VL de una rata H-Tx normal PN7. Inmunocitoquímica anti-BrdU. Se observan bien delimitadas la ZV y la ZSV. **D:** Detalle de la Z1 de un VL de una rata H-Tx normal PN7. Inmunocitoquímica anti-BrdU. Se observan numerosas células marcadas con el anticuerpo anti-BrdU a nivel de la ZSV, orientadas hacia la CMR.

3.2.6 Análisis estadístico

ANOVA y test de *t-student* fueron realizados con el programa STATISTICA 7.

Los resultados fueron considerados significativos cuando los valores de p fueron menores a 0,05 (** $p \leq 0,05$) o a 0,01 (* $p \leq 0,01$)

3.2.7 Adquisición de imágenes

Fotos de campo claro e inmunofluorescencias obtenidas con el Microscopio Zeiss Axioscope, software de captura de imágenes AxioVision versión 4.6.3.0, cámara Canon modelo Powershot A640.

Algunas fotos de las inmunofluorescencias fueron adquiridas en un Microscopio Confocal LSM700, Zeiss, software de captura de imágenes Zen600 (Zeiss), Agradecimiento: Dr. Francisco Nualart, Centro de microscopía avanzada Bío-Bío, Universidad de Concepción.

4 RESULTADOS

4.1 Resultados Capítulo I: Alteración en la distribución de las células proliferativas de la ZSV de los ventrículos laterales de la rata mutante H-Tx

Se analizaron ratas H-Tx de PN7, pues corresponde a una etapa postnatal temprana, representando un período de transición entre el estadio embrionario y el adulto. Además se analizó el proceso de neurogénesis postnatal en ratas adultas PN30 (sobrevivida promedio de las ratas H-Tx hidrocefálicas). A esta edad la actividad proliferativa del los VL corresponde netamente al fenómeno de neurogénesis postnatal.

En la rata H-Tx normal de 7 y 30 días de edad se observó que la ZSV de la pared externa de los VL donde se lleva a cabo el proceso de neurogénesis postnatal está altamente organizada, mostrando una mayor concentración de células troncales y de precursores neurales en la región dorso-lateral de los VL donde se origina la CMR, formando un “triángulo” de células proliferativas. Esta organización del nicho coincide con lo ya descrito por otros investigadores (Doetsch *et al.*, 1997) (**Figura 4A y 5A**). Las ratas hidrocefálicas a estas mismas edades, presentaron una gran dilatación de los VL, observándose además la presencia de focos de denudamiento endimario a nivel del *pallium* (**Figura 4B y 5B**). Al analizar la ZSV de la rata hidrocefálica en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina, se observó que la células stem/progenitores neurales se distribuían de manera irregular, destacando una reducción en la región dorso-lateral de los VL, perdiendo la organización de la ZSV en esta región de forma triangular que caracteriza al animal normal. A nivel de la pared lateral- ventral del ventrículo, tanto en PN7 como en PN30 se observó una mayor densidad de células en la rata hidrocefálica al ser comparada con la rata normal (**Figura 4B y 5B**).

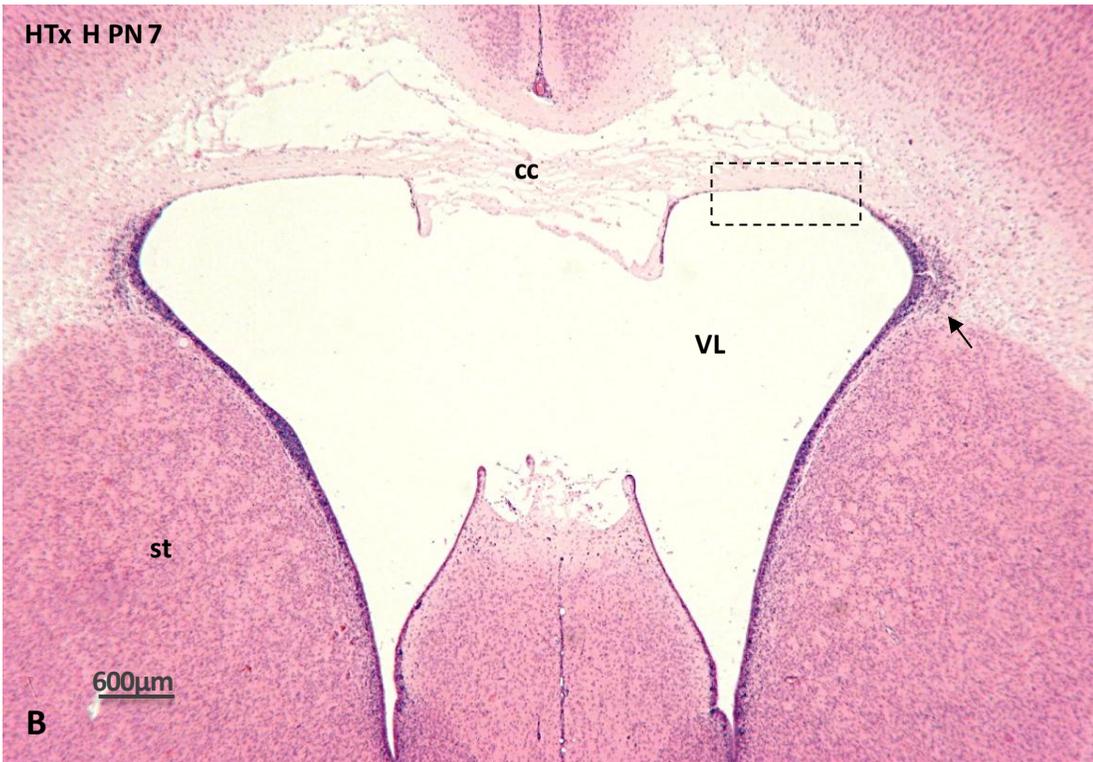


Figura 4. Sección frontal de encéfalo de rata H-Tx PN7 teñidos con H/E: **A** Corte frontal de cerebro de rata normal PN7. Se observa que la ZSV posee gran cantidad de células distribuidas en forma de “triángulo”. Estas células forman parte de la corriente migratoria rostral (**flecha**). Ventriculos laterales (VL), cuerpo calloso (cc), estriado (st). **B:** Corte frontal de cerebro de rata hidrocefálica PN7. Se observa la gran dilatación ventricular. En la pared dorsal se ve que existen zonas donde el epéndimo se ha denudado (**recuadro**). Se observa anomalía en las zonas del nicho neurogénico de la ZSV y la corriente migratoria dorsal (**flecha**).

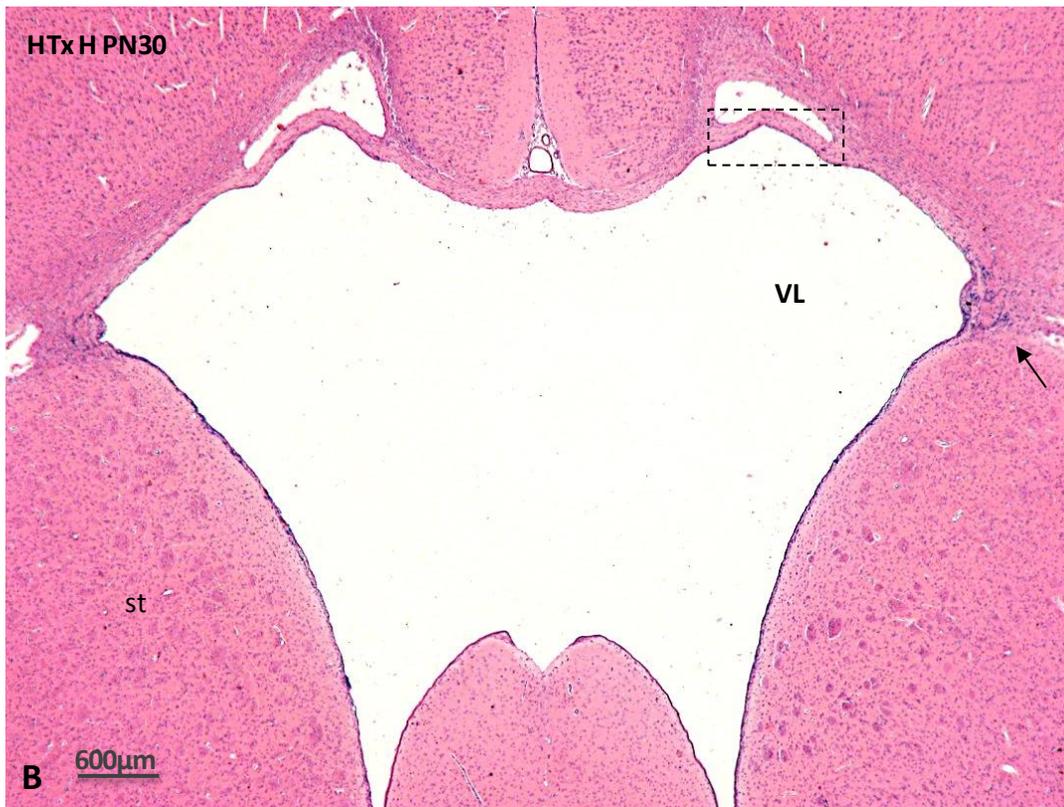
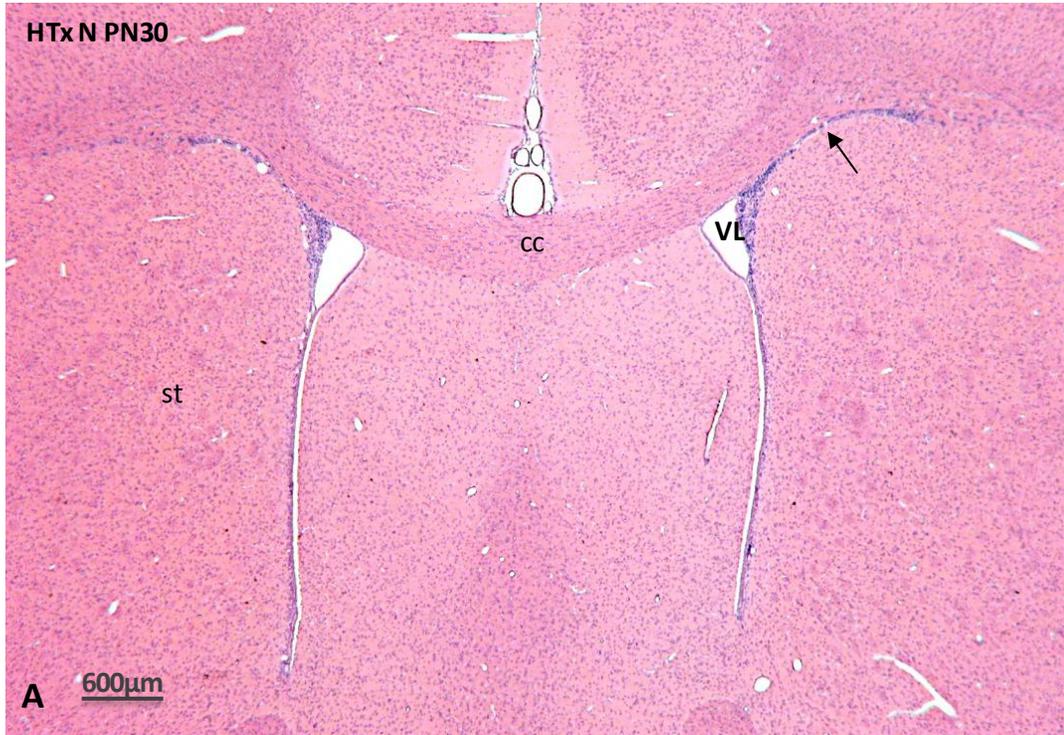


Figura 5. Sección frontal de encéfalo de rata H-Tx PN30 teñidos con H/E: **A** Corte frontal de cerebro de rata normal PN30. Se observa que la ZSV posee gran cantidad de células distribuidas en forma de “triángulo”. Estas células forman parte de la corriente migratoria rostral (**flecha**). Ventriculos laterales (VL), cuerpo calloso (cc), estriado (st). Existe una organización de las células de la ZSV hacia la CMR. **B:** Corte frontal de cerebro de rata hidrocefálica PN30. Se observa la gran dilatación ventricular. En la pared dorsal se ve que existen zonas donde el epéndimo se ha denudado (**recuadro**). Se observa anomalía en las zonas del nicho neurogénico de la ZSV y la corriente migratoria dorsal (**flecha**).

Para evaluar la capacidad proliferativa y la distribución de estas células en la ZSV, se llevó a cabo un protocolo de marcaje con pulso de BrdU que nos permitió observar las células que estaban en fase S del ciclo celular en ese instante.

4.1.1 Análisis de la capacidad proliferativa de la ZSV de ratas H-Tx mediante un pulso de BrdU en ratas H-Tx PN7.

El marcaje con una sola dosis de BrdU (pulso y caza) nos permitió identificar las células que en ese momento están proliferando, ya que la BrdU es incorporada durante la fase S del ciclo celular, por lo tanto las células marcadas con BrdU representaran células que se encuentran en ese estadio premitótico. Este protocolo consiste en la inyección intraperitoneal de una dosis de BrdU y sacrificio de la rata 1 hora postinyección. Todas las ratas fueron inyectadas a la misma hora (10:00 AM). En la presente tesis sólo se muestra el análisis de ratas normales e hidrocefálicas PN7 que recibieron este protocolo de inyección, dado que el análisis preliminar de una rata normal e hidrocefálica de PN30 mostró escasas células BrdU positivas. En la rata normal de PN7 las células inmunoteñidas con el anticuerpo anti-BrdU fueron observadas en toda la ZSV de los VL, destacando la presencia de una gran cantidad de células BrdU+ en la ZSV de la región dorso-lateral de los VL. A este nivel las células se distribuyeron formando un “triángulo” de células proliferativas orientadas hacia la CMR. Bajo esta condición normal se observó una baja concentración de células proliferativas (BrdU +) en la ZSV de la pared latero-ventral de los VL. A esta edad en la rata normal también fue posible observar células BrdU + a nivel cortical. El estudio comparativo con la rata hidrocefálica de la misma edad mostró una drástica reducción en el número de células que incorporaron BrdU a nivel de la región dorso-lateral de los VL de las

ratas hidrocefálicas comparadas con las ratas normales (**Figura 6A y B**). En cambio, en la pared lateral externa del VL de la rata hidrocefálica se observó un aumento de células BrdU+ (**Figura 6B**). Sin embargo, la cuantificación del número total de células que incorporaron BrdU no mostró una diferencia significativa, entre las ratas normales e hidrocefálicas. (**Figura 6C**). En la rata hidrocefálica PN7, también fue posible encontrar células inmunopositivas para BrdU a nivel cortical.

Considerando este resultado y dada la notoria diferencia observada en la distribución de las células proliferativas de la ZSV del VL, para realizar el estudio cuantitativo de las células BrdU positivas se decidió dividir la zona neurogénica del VL en 2 zonas, a las cuales designamos: zona 1 (Z1) correspondiente a la región dorso-lateral desde donde se origina la CMR, y zona 2 (Z2) que corresponde a la pared latero externa ventral del VL (*ver materiales y métodos* **Figura 3**).

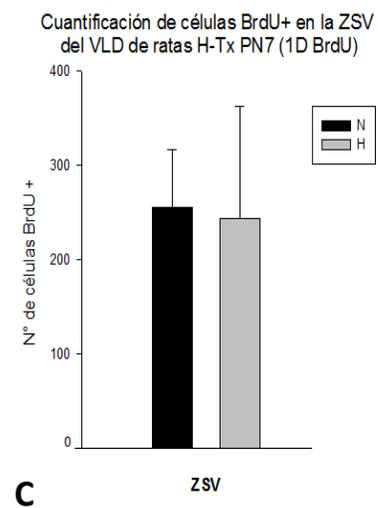
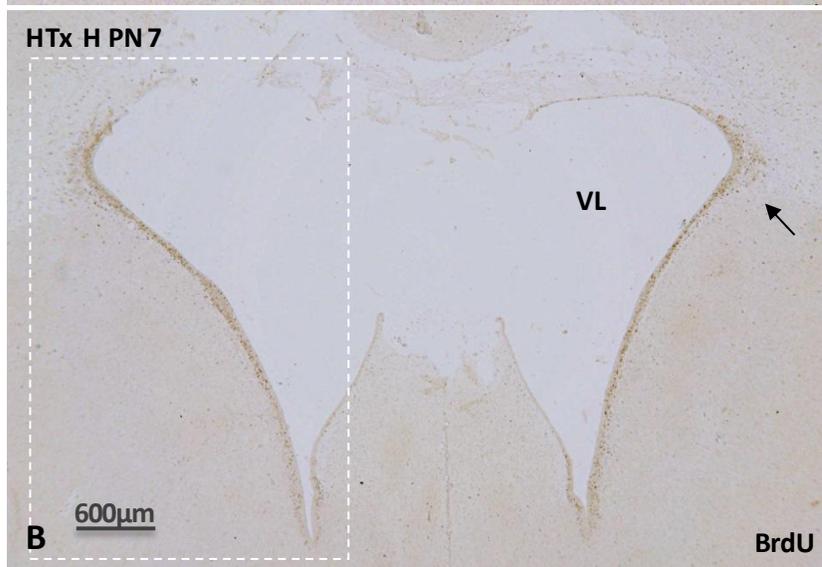
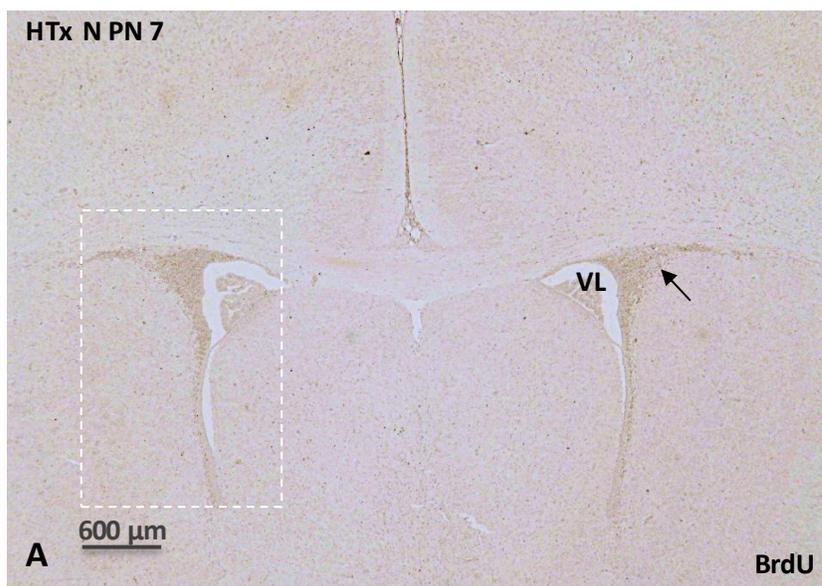


Figura 6. Análisis de la actividad proliferativa en la ZSV de un VL de ratas H-Tx PN7 mediante marcaje con pulso de bromodeoxiuridina (BrdU). Inmunocitoquímica con anti-BrdU. A: Corte frontal de encéfalo de rata que muestra una imagen panorámica de los VL de una rata normal PN7. Se observa una gran cantidad de células en la zona de neurogénesis postnatal de la ZSV que presenta inmunorreacción positiva para BrdU (**flecha**). **B:** Corte frontal de encéfalo de rata que muestra una imagen panorámica de los VL de una rata hidrocefálica PN7. Se observa una reducción de las células BrdU positivas en la ZSV que origina la corriente migratoria dorsal (**flecha**) y un mayor número de estas en la ZSV de la pared lateral del VL. **C:** Análisis cuantitativo del número total de células BrdU + en la ZSV del ventrículo completo (**recuadro blanco en A y B**). No se observaron diferencias significativas. entre las ratas normales e hidrocefálicas.

4.1.2 Cuantificación de células proliferativas en la Z1 y Z2 del ventrículo lateral de ratas H-Tx PN7 que recibieron marcaje con un pulso de BrdU.

Los mismos cortes de los cerebros de las ratas que recibieron el protocolo de pulso y caza de BrdU que fueron utilizados para realizar la cuantificación del número total de células BrdU+ a nivel de la ZSV del VL, se utilizaron para una cuantificación por zona a nivel del VL. Las ratas hidrocefálicas mostraron a nivel de la Z1 una reducción considerable en el número de células BrdU positiva en ZSV, representando solo un 28% del total de células inmunopositivas para BrdU a nivel de la ZSV de los VL (**Figura 7B, C**). En la rata normal las células BrdU positivas alcanzaron el 80% del total de células BrdU positivas de la ZSV de los VL (**Figura 7A, C**). Este resultado concuerda con el hecho que la Z1 corresponde a la zona con mayor cantidad de células proliferativas, por que representa la región donde se origina la CMR. El análisis cuantitativo demostró una reducción significativa ($p \leq 0,05$) en la Z1 de la rata hidrocefálica respecto de la rata normal (**Figura 7C**).

Al analizar la actividad proliferativa en la región designada como Z2 se observó un fenómeno distinto. En la rata normal de PN7 un 20% de las células que incorporaron BrdU se ubicaron en la ZSV de la Z2 (**Figura 8A, C**) a diferencia de la rata hidrocefálica que presentó un incremento de células proliferando en la ZSV de la Z2 correspondiendo al 72% del total de células proliferativas en la ZSV (**Figura 8B, C**). El estudio cuantitativo mostró un incremento significativo de células proliferando a nivel de la Z2 en la rata hidrocefálicas H-Tx (* $p \leq 0,01$) respecto de la rata normal (**Figura 8C**).

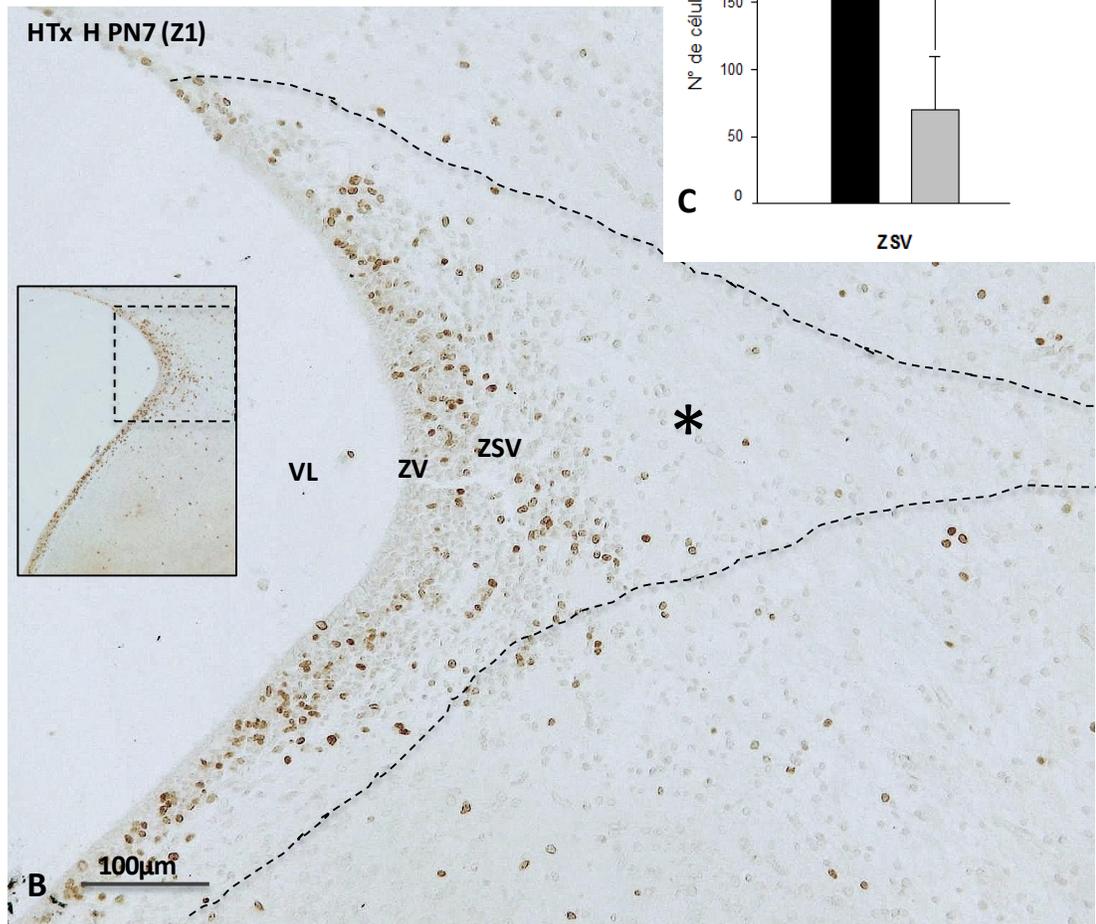
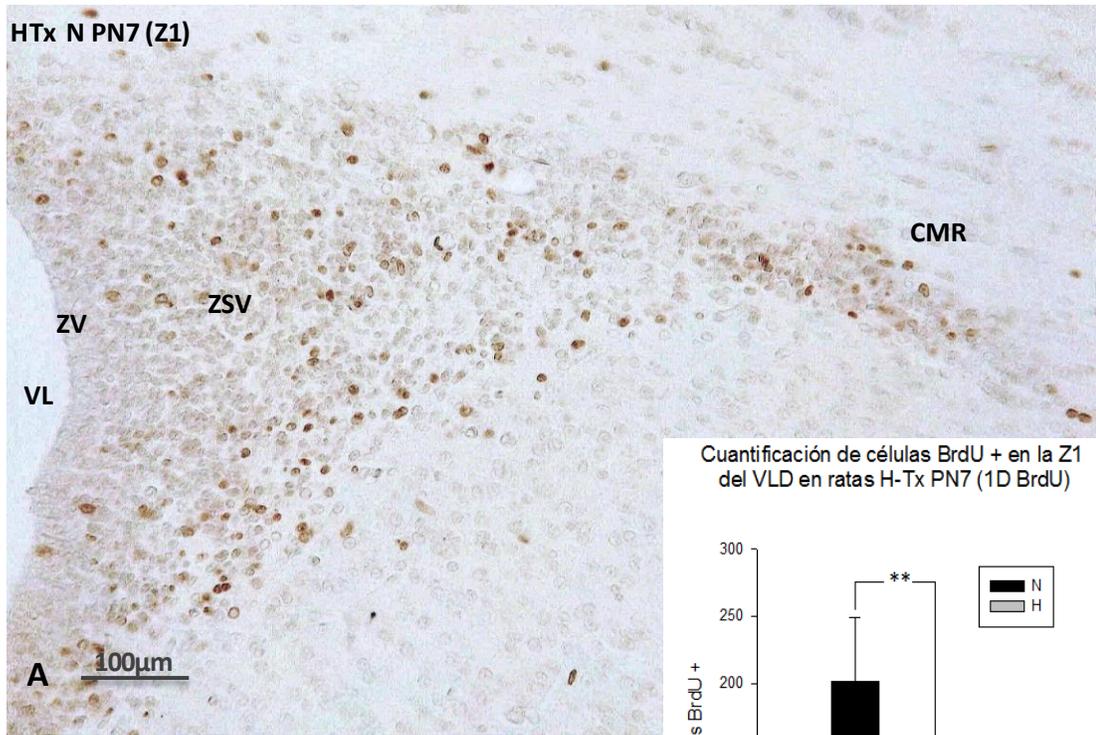


Figura 7. Análisis de la actividad proliferativa en la ZSV de la Z1 de los VL de ratas H-Tx PN7 mediante marcaje por pulso de BrdU. Inmunocitoquímica anti-BrdU. A: Detalle de la Z1 del VL de una rata normal PN7. Se observa una gran cantidad de células de la ZSV que presenta inmunorreacción positiva para BrdU, orientadas hacia la CMR, formando un triángulo de células proliferativas. **B:** Detalle de la Z1 del VL de una rata hidrocefálica PN7. Se observa una reducción de las células BrdU positivas hacia la CMR. Pérdida de la distribución de las células proliferativas en forma de triángulo (**línea negra discontinua**). Se observa una mayor densidad de células proliferativas en la región más cercana al VL, con una población heterogénea de células BrdU+. En la extensión hacia la CMR disminuye la densidad de células BrdU + (**asterisco**). **C:** Análisis cuantitativo del número de células BrdU + en la ZSV de la Z1 del VL de ratas H-Tx PN7 que recibieron marcaje con pulso de BrdU. Se obtuvieron diferencias significativas (** $p \leq 0,05$ Student's t-test)

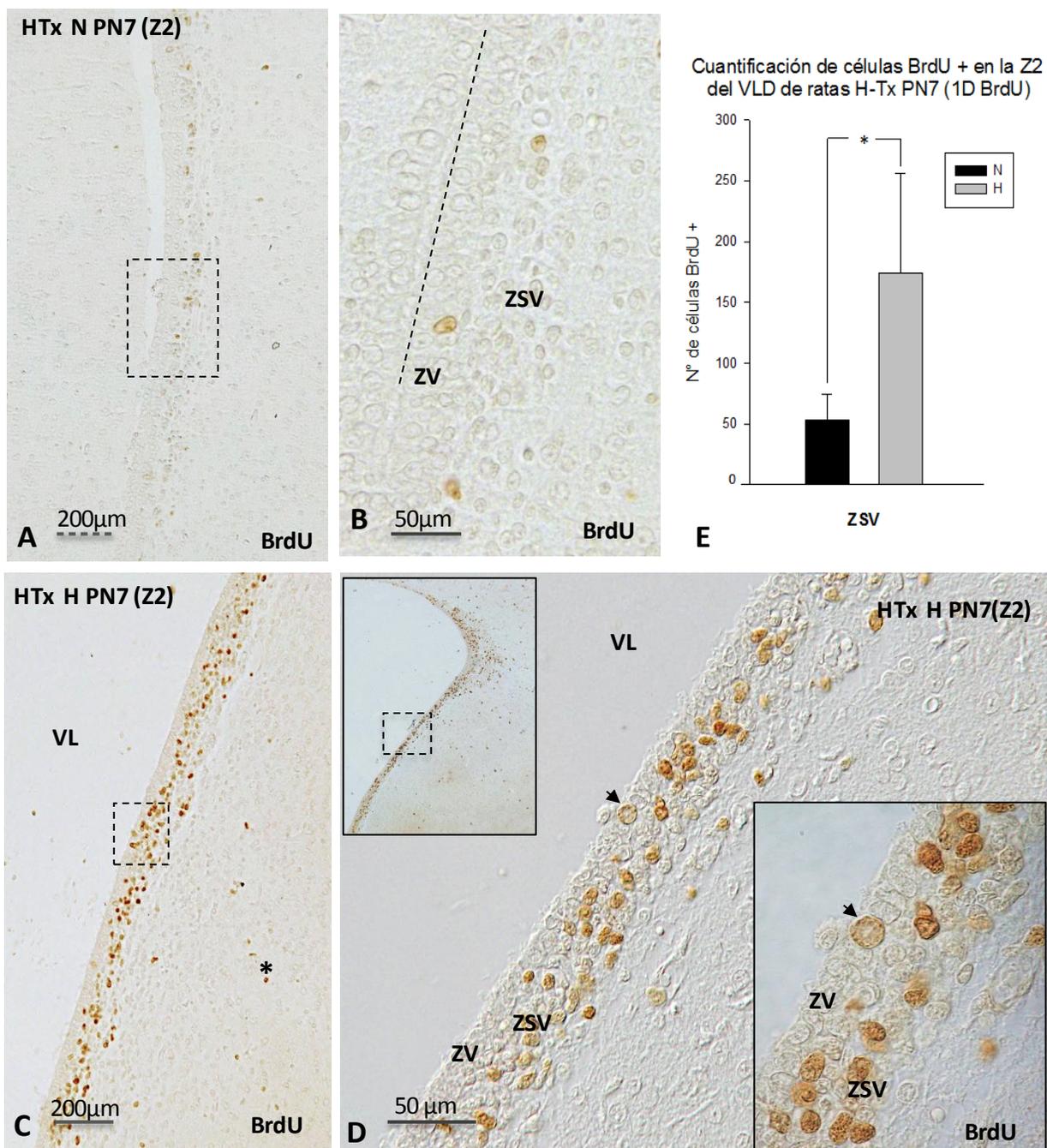


Figura 8. Análisis de la actividad proliferativa en la ZSV de la Z2 de ratas H-Tx PN7 mediante marcaje por pulso de BrdU. Inmunocitoquímica anti-BrdU. **A:** Detalle de la Z2 del VL de una rata normal PN7. Se observan pocas células de la ZSV de la Z2 inmunopositiva para BrdU. **B.** Detalle del recuadro en A: Microscopía por contraste de interferencia diferencial (DIC) de Nomarsky. Se observa la ZV y ZSV bien delimitadas. La línea discontinua representa el VL. Pocas células dieron inmunoreacción para BrdU. **C:** Detalle de la Z2 del VL de una rata hidrocefálica PN7. Se observa un notorio aumento de las células BrdU + respecto al animal normal. Presencia de células inmunorreactivas alejadas de la ZSV de la Z2 (**asterisco**). **D.** Detalle del recuadro en B: Microscopía por contraste de interferencia diferencial (DIC) de Nomarsky. La imagen de la esquina superior izquierda muestra una panorámica del VL detallando la región de donde se obtuvieron las fotos de la Z2 (recuadro). Se observan células BrdU+ en la ZV del VL (**flecha**). Presencia de gran cantidad de células proliferativas en la ZSV. Se muestra en mayor detalle en la figura insertada en el lado derecho **E:** Análisis cuantitativo del número de células BrdU + en la ZSV de la Z2 del VL de ratas H-Tx PN7 que recibieron marcaje con pulso de BrdU. Se obtuvieron diferencias significativas (* $p \leq 0,01$ Student's t-test).

En la vecindad de la ZSV hacia el estriado se observaron algunas células positivas para BrdU en las ratas hidrocefálicas (**Figura 8C**). Además destaca la presencia de células que incorporaron BrdU en la ZV en ratas mutantes H-Tx, resultado que será discutido más adelante.

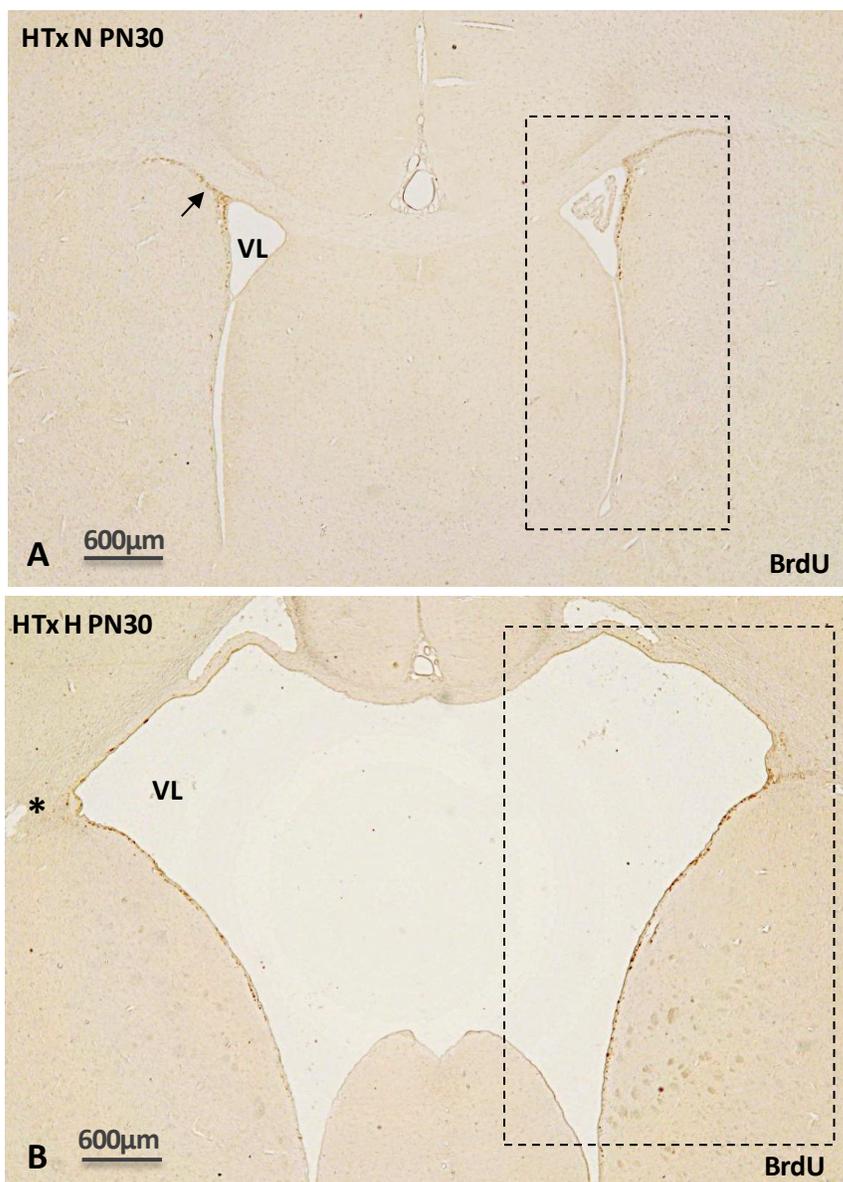
Para investigar si la gran cantidad de células proliferativas ubicadas en la Z2 en ratas mutantes migraban hacia algún lugar o se quedaban en esa región, decidimos realizar marcaje acumulativo con 3 pulsos diarios de BrdU durante 3 días.

4.1.3 Análisis de la capacidad proliferativa de la ZSV de ratas H-Tx mediante marcaje acumulativo de BrdU en ratas H-Tx PN7 y PN30.

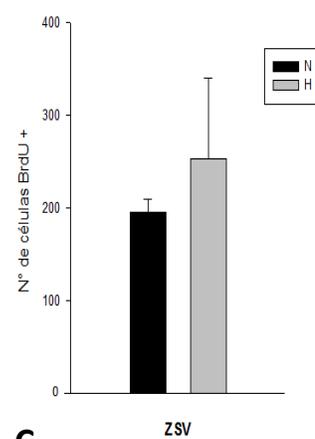
El protocolo acumulativo consistió en la inyección de 3 dosis diarias durante 3 días y sacrificio de las ratas 1 hora después de la última inyección, este protocolo permite hacer un seguimiento de la actividad proliferativa y evaluar migración de los neuroblastos desde la ZSV. Ratas PN7 y PN30 recibieron este protocolo de inyección.

Al comparar la capacidad proliferativa de las ratas normales de PN7 y PN30, se observó que bajo condiciones normales existe una reducción en el número de células proliferativas a nivel de la ZSV de los VL con el transcurso de la edad, encontrándose un bajo número de células BrdU positivas en PN30 (Comparar **Figura 9A** y **Figura 6A**).

El análisis cuantitativo del número total de células BrdU+ de la ZSV del VL completo realizado en PN7 y PN30 de animales normales e hidrocefálicos, mostró resultados similares en ambas edades. La **Figura 9**, muestra imágenes representativas de lo observado en PN30, en que se observa que no hay diferencia en el número total de células BrdU + entre la condición normal e hidrocefálica.



Quantificación de células BrdU + en la ZSV del VLD en ratas HTx PN30



C

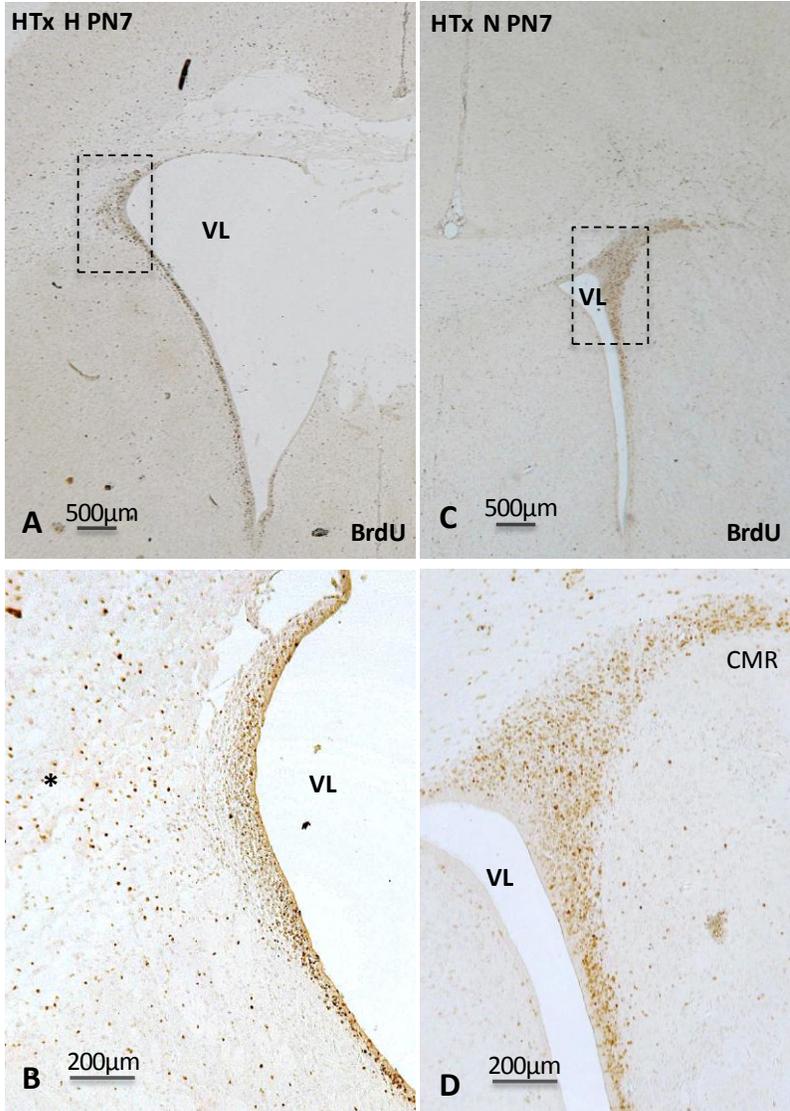
Figura 9. Análisis cuantitativo de las células proliferativas de la ZSV de un VL de ratas H-Tx PN30 mediante marcaje acumulativo de BrdU. Inmunocitoquímica anti-BrdU. **A:** Corte frontal que muestra un VL de una rata normal PN30. Se observan células en la zona de neurogénesis postnatal de la ZSV y CMR que presenta inmunorreacción positiva para BrdU (**flecha**). A diferencia de los animales PN7 con marcaje acumulativo (Figura 4A) no se observan células BrdU+ en zonas adyacentes a la ZSV. **B:** Corte frontal que muestra el VL de una rata hidrocefálica PN30. Se observa una reducción de las células BrdU positivas hacia la CMR (**asterisco**) y un mayor número de estas en la ZSV de la pared lateral del VL. **C:** Análisis cuantitativo del número total de células BrdU + en la ZSV del ventrículo completo (**recuadro blanco** en **A** y **B**). No se observaron diferencias significativas entre las ratas normales e hidrocefálicas.

En PN30 también fue posible observar alteraciones a nivel de la ZV, observándose las células ependimarias de la ZV de las ratas hidrocefálicas de forma alargada o estirada.

4.1.4 Cuantificación de células proliferativas de la Z1 y Z2 del ventrículo lateral en ratas H-Tx que recibieron marcaje acumulativo de BrdU en ratas PN7 y PN30.

Al realizar el protocolo de marcaje acumulativo de BrdU en ratas PN7, se obtuvo un mayor número de células inmunopositivas para BrdU a nivel de la ZSV, comparado con el protocolo de marcaje por pulso descrito anteriormente. Los análisis cuantitativos realizados para ratas de PN7 que recibieron marcaje acumulativo con BrdU mostraron un fenómeno similar a los resultados obtenidos para el marcaje con pulso en cuanto a la distribución de las células proliferativas a lo largo del VL. En la rata H-Tx normal de PN7 se observó una gran cantidad de células proliferativas en la ZSV de la Z1 orientadas hacia la CMR, representando un 78% del total de células proliferando de la ZSV de los VL (**Figura 10A, C**). En cambio, en la rata hidrocefálica se encontró una reducción drástica y significativa del número de células BrdU positivas a nivel de la Z1, representando solo un 17% del total de células inmunopositivas para BrdU a nivel de la ZSV de los VL ($p \leq 0,05$) (**Figura 10B, C**). La **figura 10A y B** muestran imágenes representativas de la Z1 de cada condición en ratas PN7.

En la rata normal un 22% de las células que incorporaron BrdU se ubicaron en la ZSV de la Z2 a diferencia de la rata mutante que presentó un notorio incremento de células BrdU positivas en la ZSV de la Z2, correspondiendo a un 83% del total de células proliferativas en la ZSV (**Figura 11**). Este incremento del número de células inmunoteñidas para BrdU a nivel de la Z2 en la rata mutante H-Tx fue significativo ($* p \leq 0,01$) (**Figura 11C**). En la vecindad de la ZSV hacia el



Cuantificación de células BrdU + en la ZSV de Z1 en ratas H-Tx PN7

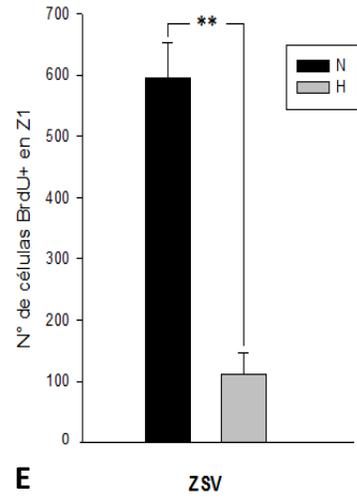
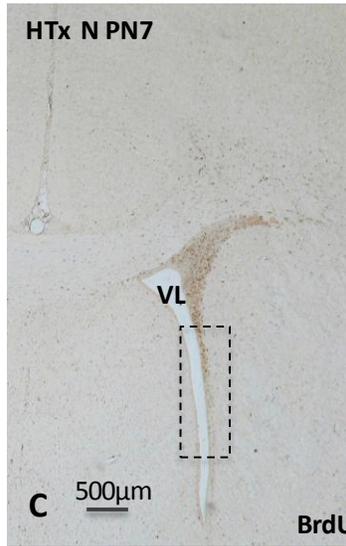


Figura 10. Análisis de la actividad proliferativa en la ZSV de la Z1 de ratas H-Tx PN7 mediante marcaje acumulativo de BrdU. Inmunocitoquímica anti-BrdU. **A:** Panorámica del VL izquierdo de una rata H-Tx hidrocefálica. **B:** Detalle de la Z1 (**recuadro en A**) del VL de una rata hidrocefálica PN7. Se observa una reducción de las células BrdU positivas hacia la CMR se pierde la distribución de las células en forma triangular (**asterisco**), característica del animal normal. Nótese la diferencia que existe en la organización de las células BrdU + en la ZSV de la Z1 del VL de ratas H-Tx PN7. **C:** Panorámica del VL izquierdo de una rata H-Tx normal **D:** Detalle de la Z1 (**recuadro en C**) del VL de una rata normal PN7. Se observa una gran cantidad de células heterogéneas de la ZSV que presenta inmunorreacción positiva para BrdU. Se visualiza la correcta orientación de las células positivas para BrdU hacia la CMR. **E:** Análisis cuantitativo del número de células BrdU + en la ZSV de la Z1 del VL de ratas H-Tx PN7 que recibieron marcaje acumulativo de BrdU. Se obtuvieron diferencias significativas (** $p \leq 0,05$ Student's t-test)



Quantificación de células BrdU + en la ZSV de Z2 en ratas HTx PN7

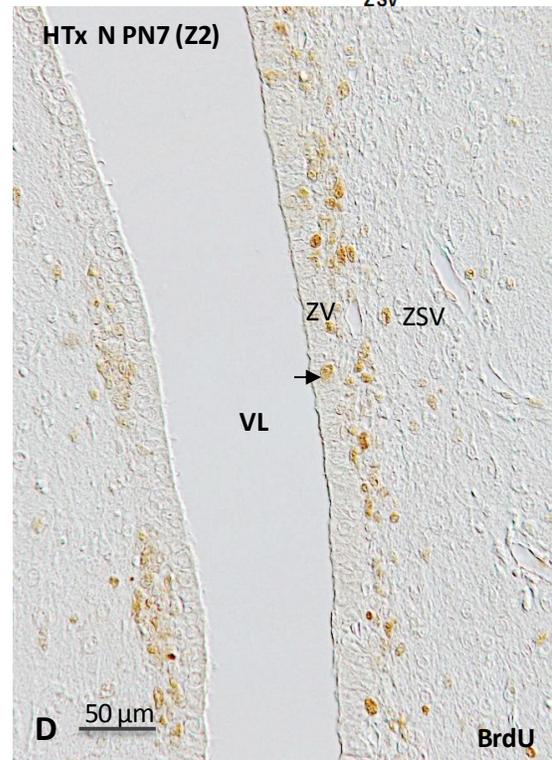
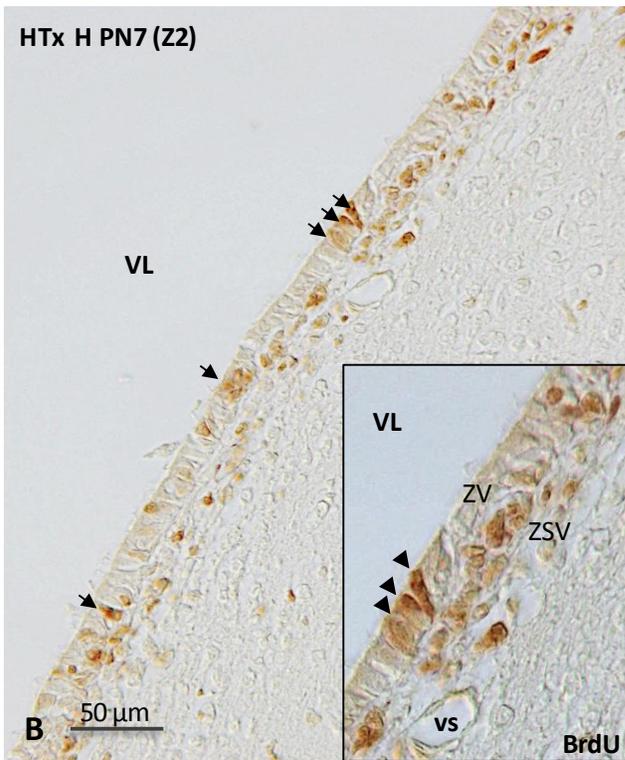
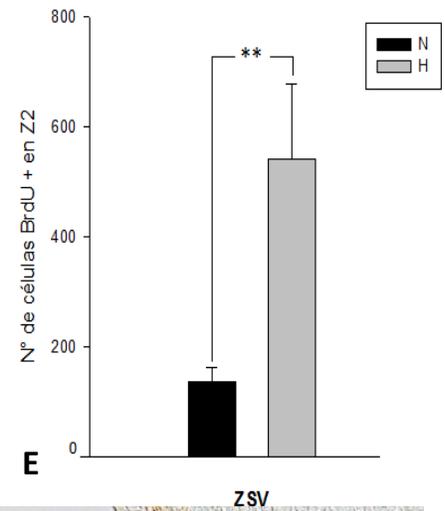


Figura 11. Análisis de la actividad proliferativa en la ZSV de la Z2 de ratas H-Tx PN7 mediante marcaje acumulativo de bromodeoxiuridina (BrdU). Inmunocitoquímica anti-BrdU.

A: Panorámica del VL izquierdo de una rata hidrocefálica PN7 **B:** Microscopía por contraste de interferencia diferencial (DIC) de Nomarsky. Corte frontal que muestra la Z2 del VL de una rata hidrocefálica PN7 (detalle del recuadro en A). Se observan células de la ZSV de la Z2 inmunopositiva para BrdU. Existe inmunorreactividad para algunas células de la ZV (**flechas**). En el *insert* se observan las células BrdU+ en la ZV y en la ZSV se encuentran formando grupos y en la cercanía de vasos sanguíneos (vs) **B:** Corte frontal que muestra la Z2 del VL de una rata hidrocefálica PN7. Se observa un notorio aumento de las células BrdU + respecto al animal normal. Destaca la presencia de células BrdU + en la ZV de la Z2 del VL de ratas hidrocefálicas a diferencia de los animales normales (**flechas**). Se observan células inmunoreactivas en la zona del estriado (**asterisco**) **C:** Panorámica del VL derecho de una rata normal PN7 **D:** Microscopía por contraste de interferencia diferencial (DIC) de Nomarsky. Corte frontal que muestra la Z2 del VL de una rata normal PN7 (detalle del recuadro en C). Se observan células proliferando a nivel de la ZSV y sólo pocas células se marcan en la ZV (**flecha**) **E:** Análisis cuantitativo del número de células BrdU + en la ZSV de la Z2 del VL de ratas H-Tx PN7 que recibieron marcaje acumulativo de BrdU. Se obtuvieron diferencias significativas (* $p \leq 0,01$ Student's t-test).

estriado se observaron algunas células positivas para BrdU tanto en las ratas normales e hidrocefálicas, siendo más notorio en la rata hidrocefálica (**Figura 11A y B**).

El análisis cuantitativo por zonas en PN30 utilizando marcaje acumulativo de BrdU, reveló un fenómeno similar a lo observado en ratas H-Tx de PN7. A esta edad se encontró que la mayor cantidad de células con capacidad proliferativa (BrdU +) se ubican en la Z1 en ratas normales, representando un 82% del total de células proliferativas de la ZSV de los VL (**Figura 12A y C**). En cambio, la rata hidrocefálica presentó una reducción en el número de células con capacidad proliferativa a nivel de la Z1, lo cual representa un 29% del total de células inmunopositivas para BrdU a nivel de la ZSV de los VL (**Figura 12B y C**). El análisis cuantitativo demostró una reducción significativa ($p \leq 0,05$) en la Z1 en la rata hidrocefálica de PN30 (**Figura 12C**). La **figura 12** muestra imágenes representativas de la Z1 del VL de ratas de PN30 normal e hidrocefálica.

En la rata normal de PN30 un 18% de las células que incorporaron BrdU se ubicaron en la ZSV de la Z2 (**Figura 13A y C**) a diferencia de la rata mutante que presentó un incremento en el número de células BrdU positivas en la ZSV de la Z2 correspondiendo al 79% del total de células proliferativas de la ZSV de los VL (**Figura 13B y C**). El análisis cuantitativo mostró un incremento significativo de células con capacidad proliferativa a nivel de la Z2 en la rata hidrocefálica H-Tx de PN30 (* $p \leq 0,01$) (**Figura 13C**).

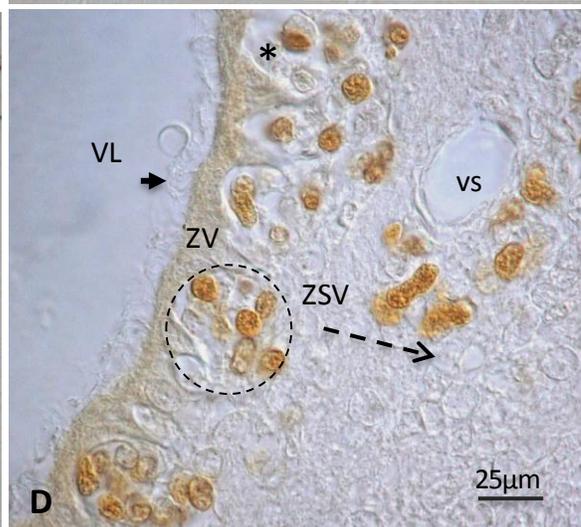
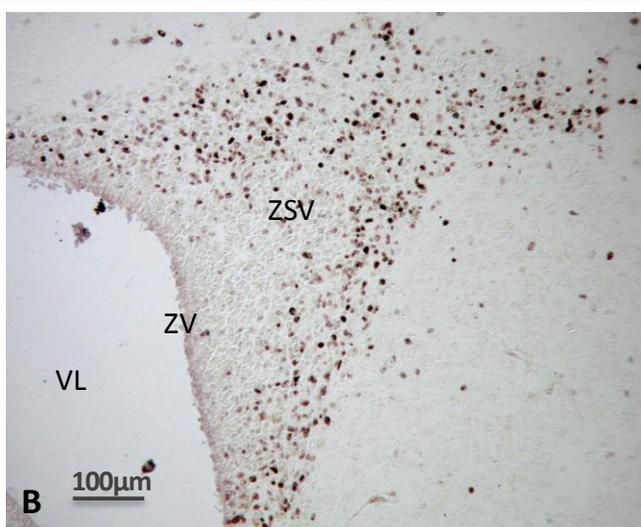
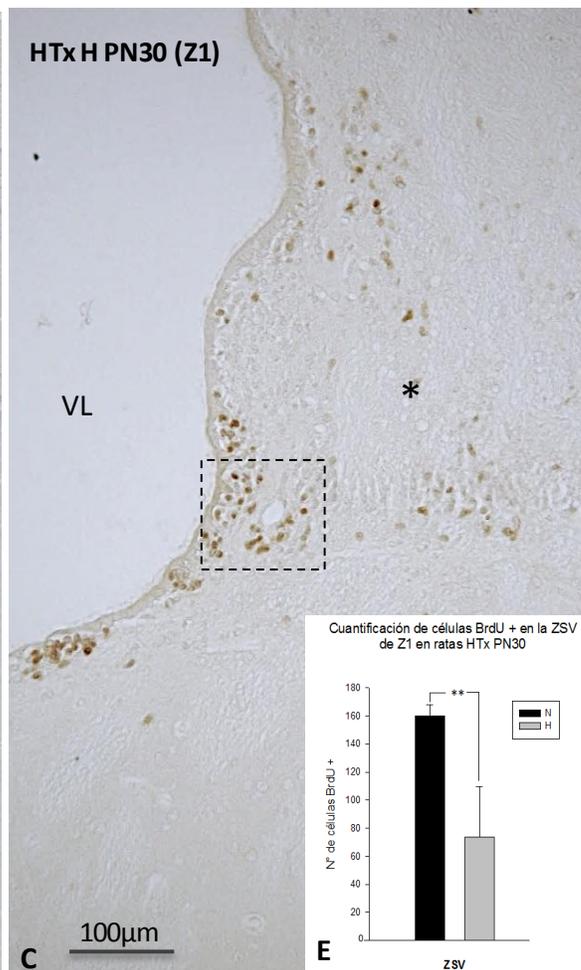
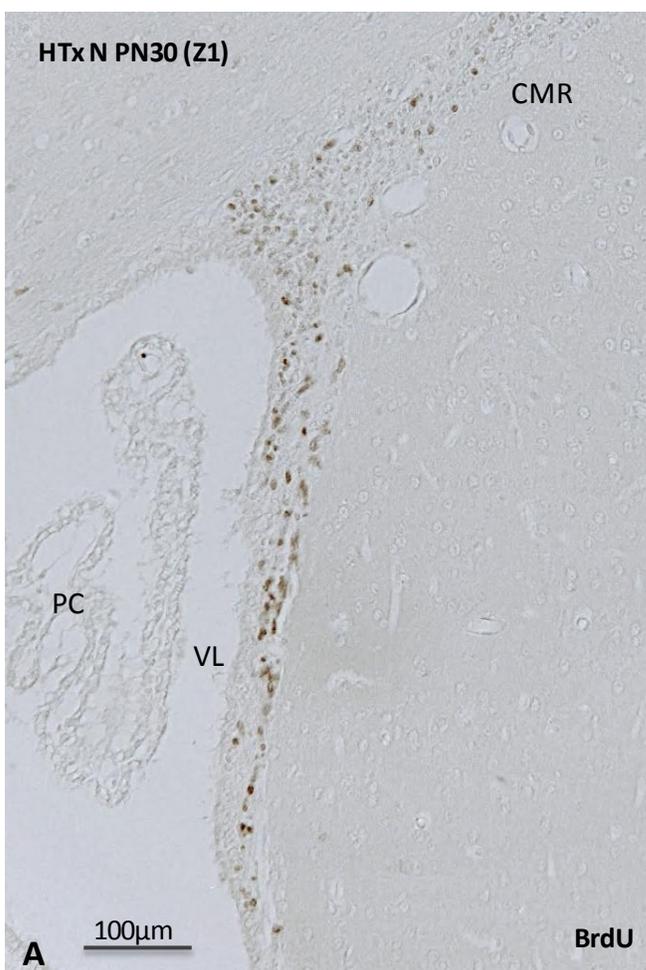
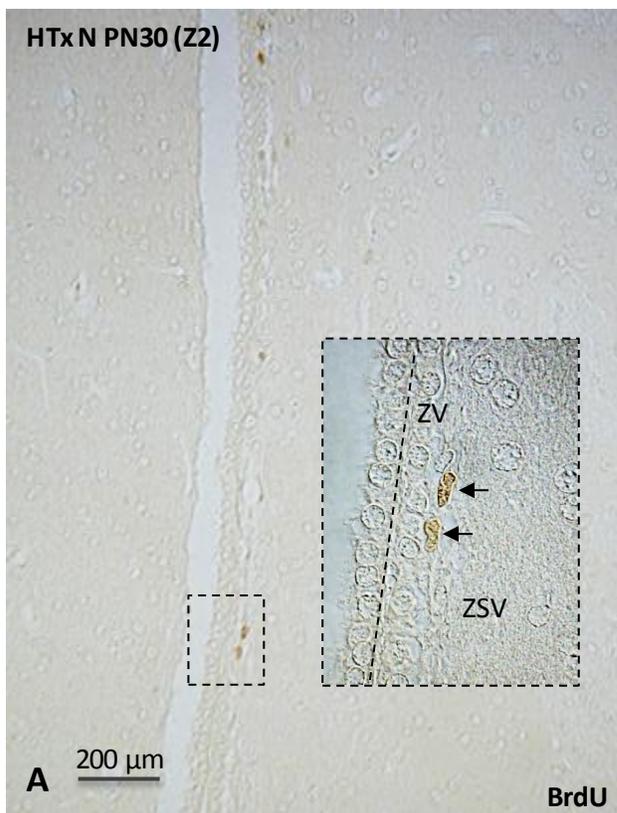
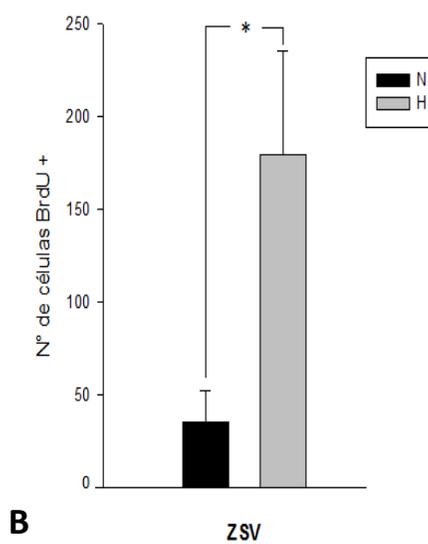


Figura 12. Análisis de la actividad proliferativa en la ZSV de la Z1 de ratas H-Tx PN30 mediante marcaje acumulativo de BrdU. Inmunocitoquímica anti-BrdU. A: Detalle de la Z1 de una rata normal PN30. Se observan células de la ZSV que presenta inmunorreacción positiva para BrdU. Se visualiza la correcta orientación de las células positivas para BrdU hacia la CMR (formación del triángulo). Pc: plexos coroideos. **B:** Se observa la ZV y ZSV bien delimitadas, con células inmunopositivas para BrdU en la ZSV. Las células proliferativas se disponen formando el triángulo que dirige a estas células hacia la CMR **C:** Detalle de la Z1 de una rata hidrocefálica PN30. Se observa una reducción de las células BrdU positivas hacia la corriente migratoria rostral, se pierde la distribución de las células en forma triangular característica del animal normal (**asterisco**). **D:** Detalle del recuadro en C. Microscopía por contraste de interferencia diferencial (DIC) de Nomarsky. Nótese la diferencia que existe en la organización de las células BrdU + en la ZSV de la Z1 del VL de ratas H-Tx PN30. La ZV está compuesta por células endimarias elongadas, se observan las cilias (**flecha**). Las células BrdU+ en la ZSV se agrupan formando nódulos (**círculo**). Células proliferativas se encuentran en la cercanía de un vaso sanguíneo (vs). Las células cercanas a la superficie ventricular se disponen en “nidos” de células proliferativas que podrían migrar y salir de esos nódulos (flecha discontinua) **E:** Análisis cuantitativo del número de células BrdU + en la ZSV de la Z1 del VL de ratas H-Tx PN30 que recibieron marcaje acumulativo de BrdU. Se obtuvieron diferencias significativas (** $p \leq 0,05$ Student's t-test).



Cuantificación de células BrdU + en la ZSV de Z2 en ratas HTx PN30



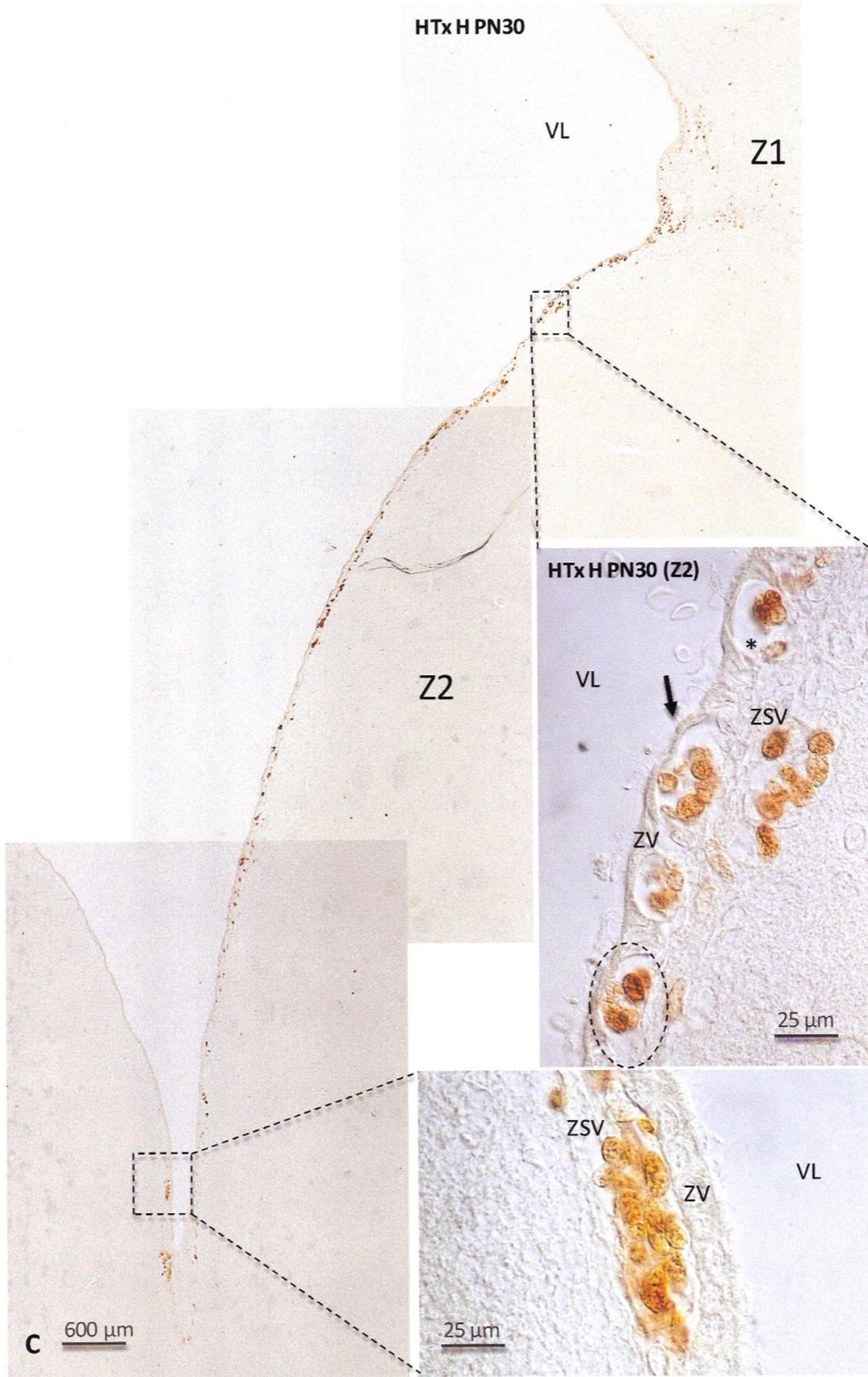


Figura 13. Análisis de la actividad proliferativa en la ZSV de la Z2 de ratas H-Tx PN30 mediante marcaje acumulativo de BrdU. Inmunocitoquímica anti-BrdU. A: Detalle de la zona proliferativa Z2 de una rata normal PN730. Se observan células de la ZSV de la Z2 inmunopositiva para BrdU. En el *insert* se muestra en detalle las células BrdU+ presentes en la ZSV del VL. La línea discontinua muestra la parte del VL que se encuentra unido en la Z2. **B:** Análisis cuantitativo del número de células BrdU + en la ZSV de la Z2 del VL de ratas H-Tx PN30 que recibieron marcaje acumulativo de BrdU. Se obtuvieron diferencias significativas (* $p \leq 0,01$ Student's t-test) **C:** Montaje del VL de una rata hidrocefálica PN30. En las imágenes insertadas en la figura se muestra el detalle de los recuadros ubicados en el montaje del VL (Microscopía por contraste de interferencia diferencial (DIC) de Nomarsky), mostrando en detalle la Z2 de una rata hidrocefálica PN30. Se observa una gran densidad de células proliferativas a nivel de la Z2. Presencia de grupos o nódulos de células proliferativas a nivel de la ZSV (**círculos**). Células endimarias que presentan sus cilias (**flecha**) muestran una forma alargada. Destaca la presencia de “cavidades” (asterisco) donde se ubican las células proliferativas de la ZSV cercanas a la superficie ventricular. El recuadro inferior de la derecha muestra un gran nódulo ubicado en la pared contralateral del VL, en esta región las células endimarias no se presentan elongadas (ZV).

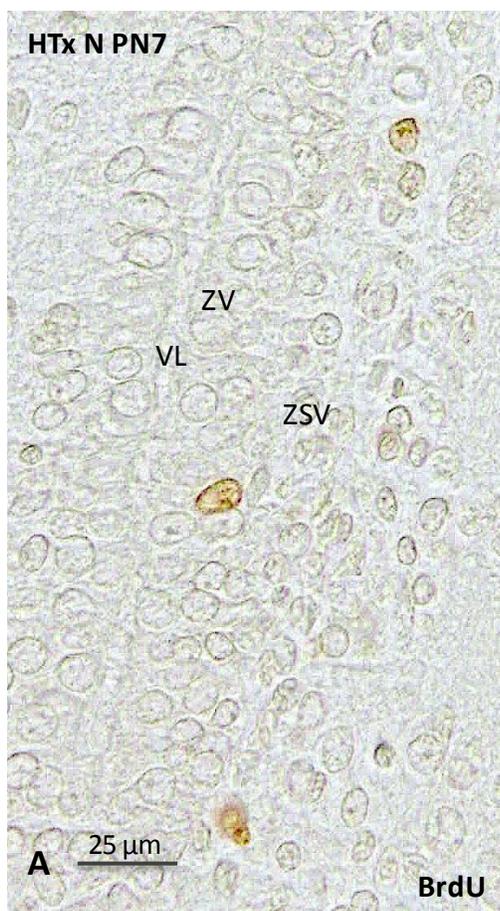
Interpretación de los resultados: (1) En la Z1 del nicho neurogénico de la rata hidrocefálica H-Tx hay una drástica reducción del número de NSCs/NPCs que incorporan BrdU y un notable incremento de las mismas en la Z2. Esto origina algunas preguntas: Los neuroblastos de la Z1 se incorporan a la CMR y migran al BO ¿Cuál es el destino, en condiciones normales de los neuroblastos de la Z2? ¿Migran a la Z1 y desde allí se incorporan a la CMR? ¿Migran a otros sitios, como el cuerpo estriado? ¿Se traslocan al LCR? ¿Mueren por apoptosis? (2) EL aumento del número de NSCs/NPCs BrdU+ en la Z2 indica que en la rata hidrocefálica y probablemente en la rata normal, los neuroblastos no migran de la Z2 a la Z1. (3) ¿Cual es el significado del aumento del número de NSCs/NPCs BrdU+ en la Z2 de la rata hidrocefálica? ¿Cuál es el destino de estos precursores neurales?

4.1.5 Cuantificación de células proliferativas en la ZV del ventrículo lateral en ratas H-Tx PN7 y PN30 que recibieron marcaje acumulativo de BrdU.

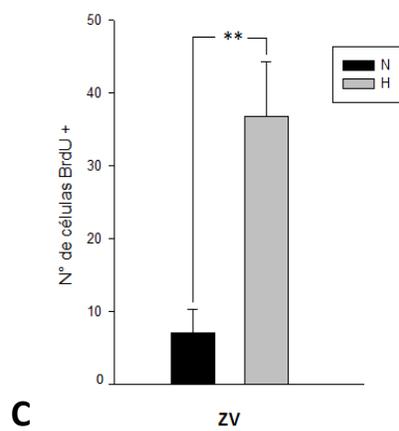
En roedores, la maduración de las células endimarias, incluyendo la aparición de los cilios y la expresión de proteínas funcionales tal como el transportador de glucosa-1 (GLUT-1) es principalmente un evento postnatal (Bátiz *et al.*, 2011). En ratas H-Tx PN7 normales la maduración de las células de la glía radial /NSCs de la ZV continúa, observándose que todas las células NSCs de la pared dorsal y latero-interna del VL se han diferenciado a epéndimo ciliado, pero aún no se diferencian completamente en la pared lateral externa del VL (Lichtin, 2012). En PN30 la ZV está tapizada completamente por epéndimo maduro.

La utilización del marcaje acumulativo con BrdU no solo permitió observar un incremento en el número de células BrdU positivas, tanto en condiciones normales como patológicas respecto al marcaje por pulso de BrdU, sino también la identificación de células con capacidad proliferativa en otras regiones tales como la ZV. Ratas normales de PN7 que recibieron marcaje acumulativo con BrdU presentaron células con actividad proliferativa a nivel de la ZV (**Figura 14A**). Estas células proliferativas en la ZV con toda probabilidad corresponderían a NSCs que aún no se han diferenciado a epéndimo en la pared lateral externa del VL. La presencia de células BrdU positivas en la ZV fue mayor en la rata H-Tx hidrocefálica. (**Figura 14B**). El estudio cuantitativo reveló incremento significativo en las ratas mutantes H-Tx PN7 ($p \leq 0,05$) (**Figura 14A, B y C**).

En ratas normales de PN 30 el marcaje acumulativo de BrdU, no reveló la presencia de células con capacidad proliferativa en la ZV. Sin embargo, sorprendentemente se encontraron células BrdU positivas en la ZV de ratas H-Tx hidrocefálicas a esta edad, mostrando diferencias significativas ($p \leq 0,01$) en relación a la rata normal (**Figura 14D, E y F**).



Cuantificación de células BrdU + en la ZV del VLD en ratas HTx PN7



Cuantificación de células BrdU+ en la ZV del VLD en ratas HTx PN30

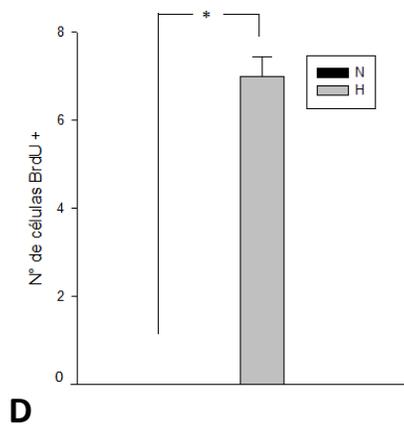


Figura 14. Análisis de la actividad proliferativa en la ZV del VL de ratas H-Tx PN7 y PN30 mediante marcaje acumulativo de BrdU. Inmunocitoquímica anti-BrdU. Microscopía por contraste de interferencia diferencial (DIC) de Nomarsky. A: Detalle de la Z2 de una rata H-Tx normal PN7. Normalmente existe proliferación a nivel de la ZV en ratas PN7 **B:** Detalle de la Z2 de una rata H-Tx hidrocefálica PN7. Existe un incremento en el número de células BrdU+ en la ZV de ratas hidrocefálicas PN7 **C:** Análisis cuantitativo del número de células BrdU + en la ZV del VL de ratas H-Tx PN7 que recibieron marcaje acumulativo de BrdU. Se obtuvieron diferencias significativas (** $p \leq 0,05$ Student's t-test). **D:** Detalle de la Z2 de una rata H-Tx normal PN30. Normalmente no existe proliferación a nivel de la ZV en ratas PN30 **E:** Detalle de la Z2 de una rata H-Tx hidrocefálica PN30. Se observa la presencia de células proliferando en la ZV (flecha) de ratas hidrocefálicas PN30 **F:** Análisis cuantitativo del número de células BrdU + en la ZV del VL de ratas H-Tx PN30 que recibieron marcaje acumulativo de BrdU. Se obtuvieron diferencias significativas (* $p \leq 0,01$ Student's t-test).

4.2 Interpretación capítulo I: Alteración en la distribución de la actividad proliferativa de la ZSV de los ventrículos laterales en la rata mutante H-Tx

Diversos estudios muestran la existencia de diferentes fenómenos que parecen estar íntimamente asociados a la etiopatogenia de la hidrocefalia y que corresponden a alteraciones: (i) del neuroepitelio, (ii) del epéndimo ciliado (Jiménez *et al.*, 2001, Wagner 2003), (iii) del epéndimo secretorio: el OSC (Wagner *et al.*, 2003), (iv) de la composición del LCR (Mashayekhi *et al.*, 2002).

La ratas hidrocefálicas H-Tx nacen con una alteración del neuroepitelio/epéndimo, que provoca focos de denudamiento de estas células en la ZV del techo de los VL, fenómeno que ocurre inmediatamente posterior (o simultáneo) a la estenosis del AS y comienzo de la dilatación ventricular e hidrocefalia (Ortloff, 2008). El denudamiento del neuroepitelio/epéndimo de la ZV que ocurre en estas ratas deja expuestas las células de la ZSV a la cavidad ventricular y al LCR. La ZSV corresponde a una de las regiones donde la neurogénesis continúa en la etapa adulta (Doetsch *et al.*, 1999).

La actividad neurogénica postnatal de la ZSV está regulada por diferentes factores que determinan el nicho neurogénico. Las señales del microambiente, la especializada lámina basal, los componentes de la matriz extracelular y las interacciones célula –célula son críticas para mantener el nicho de las células madre neurales (Doetsch *et al.*, 2003). Incluso el batido ciliar del epéndimo es requerido para un flujo normal de LCR, la formación de un gradiente de concentración de moléculas de orientación del LCR y una migración direccional de neuroblastos (Sawamoto *et al.*, 2006).

Los resultados expuestos en la presente tesis, muestran que la tasa de proliferación de precursores neurales en ratas H-Tx controles e hidrocefálicas es similar. La alteración del proceso neurogénico se encuentra en la distribución de las células proliferativas de la ZSV de los VL, lo cual arrojó que en ratas H-Tx hidrocefálicas la actividad proliferativa está drásticamente reducida en la Z1 e incrementada en la Z2. El cambio en la actividad proliferativa en la Z1 y Z2 en las ratas hidrocefálicas en estadio PN 7 y 30, podría corresponder a: i) cambios en la actividad proliferativa de las Z1 y Z2, como mecanismo compensatorio del daño producido en la Z1 y/o ii) a una alteración en el proceso migratorio de los progenitores neurales desde la Z2 a la Z1.

La única publicación sobre hidrocefalia y neurogénesis postnatal se encuentra realizada en la cepa de ratones mutantes *hyh* (Jiménez *et al.*, 2009). En este estudio se concluyó que existe una disminución de la proliferación en la ZSV en los ratones hidrocefálicos la cual es causada por la disrupción de la ZV del nicho neurogénico, componente importante para el funcionamiento de este nicho (Jiménez *et al.*, 2009). En el caso de la rata H-Tx el defecto encontrado en la actividad proliferativa de la ZSV no podría ser vinculado directamente a la pérdida de células endimarias de la ZV, como fue descrito por Jiménez (2009) en el ratón *hyh.*, debido que la pérdida del componente endimario en la rata H-Tx se presenta en la pared dorsal de los VL y no en la zona donde se lleva a cabo el proceso de neurogénesis postnatal.

¿Cuál es el mecanismo que conlleva al cambio en la actividad proliferativa de la Z1 y Z2 en la rata H-Tx hidrocefálica?

Diversos estudios indican que las alteraciones en la composición del LCR hidrocefálico podrían interferir negativamente en el proceso neurogénico y gliogénico durante el desarrollo del cerebro fetal (Johanson y Jones, 2001; Mashayekhi *et al.*, 2002). El LCR ha sido reconocido como un

componente clave del sistema homeostático del cerebro y un modulador fisiológico de la función cerebral, tanto en etapas tempranas del desarrollo como en la etapa adulta (Mashayekhi *et al.*, 2002; Miyan *et al.*, 2003). Estudios realizados en nuestro laboratorio sobre la composición proteica del LCR de la rata H-TX normal e hidrocefálica han mostrado cambios significativos en la proteómica del animal hidrocefálico (Jaramillo, 2009). Por lo tanto, en el contexto de todos los antecedentes expuestos sobre hidrocefalia y los factores que regulan el fenómeno de neurogénesis postnatal, podría existir una influencia directa de las alteraciones en la composición y flujo del LCR presentes en la hidrocefalia de la rata H-Tx mutante sobre el defecto en la distribución de la actividad proliferativa de la ZSV en las paredes de los VL de ratas adultas.

Otra posibilidad para explicar la acumulación de células proliferativas en “nidos” en la Z2 es la presencia de un defecto en la migración de neuroblastos. Este fenómeno podría estar relacionado a alteraciones en la composición y flujo del LCR observado en ratas H-Tx hidrocefálicas (Mashayekhi *et al.*, 2002; Sawamoto *et al.*, 2006). Por otra parte, estudios recientes muestran que en condiciones de lesión, isquemia o hipoxia, existe un aumento de la neurogénesis en la ZSV y hay un redireccionamiento de los neuroblastos generados a los sitios de daño en el estriado. Estos estudios sugieren que la neurogénesis de la ZSV tendría un poder regenerativo (Kojima *et al.*, 2010; Yamashita *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2011). No se descarta la posibilidad de que dada las numerosas lesiones que presenta el cerebro de la rata hidrocefálica, exista una migración lateral de los neuroblastos hacia el estriado, desde la Z2. Esta posibilidad debería ser investigada en estudios futuros. Además sería interesante evaluar apoptosis y/o diferenciación local de estas células a nivel de la Z2 que podrían estar siendo afectadas por algunos componentes alterados del LCR hidrocefálico.

Es importante considerar también que la presencia de tubos gliales que envainan a los neuroblastos migratorios da la posibilidad de utilizar a estos como un sustrato para una migración orientada (Ghashghaei *et al.*, 2007), por lo tanto, una organización de los astrocitos en túneles es necesaria para una migración adecuada de neuroblastos. En los siguientes capítulos se analiza la organización del nicho neurogénico y la CMR.

4.3 Resultados Capítulo II: Desorganización del nicho neurogénico postnatal de la ZSV en la rata H-Tx hidrocefálica

4.3.1 Caracterización del nicho neurogénico mediante inmunofluorescencia doble BrdU/GFAP

Después de evaluar la actividad proliferativa de la ZSV, en que se encontró una alteración en la distribución de las células con capacidad proliferativa, se procedió a estudiar la organización del nicho neurogénico mediante inmunofluorescencia en ratas normales e hidrocefálicas de H-Tx PN30.

Los neuroblastos nacidos de la ZSV se unen y forman cadenas envainadas por astrocitos que conforman los túneles para formar la CMR conducida hacia el BO (Doetsch, 2003). Se realizó una inmunofluorescencia doble con anticuerpos primarios contra BrdU/GFAP para evaluar la conformación de los túneles de astrocitos (GFAP+) y la ubicación de las células proliferativas (BrdU +) dentro de ellos. Los resultados revelaron importantes diferencias entre la rata normal e hidrocefálica. En la Z1 y la CMR de la rata normal se observaron astrocitos GFAP+. Estas células se organizan formando “nidos” en la Z1 y cadenas en la CMR conteniendo en su interior células BrdU+, que con toda probabilidad corresponden a neuroblastos migratorios (**Figura 15A**). En contraste, la rata hidrocefálica mostró una organización anómala de las células GFAP positivas, encontrándose de manera dispersa y laxa en la ZSV. A nivel de la CMR sólo algunas células son inmunorreactivas con GFAP, pero que no logran constituir una organización tubular. En esta región no se lograron identificar células BrdU positivas conformando cadenas. Las pocas células encontradas en esta región se disponen de forma aislada (**Figura 15B**).

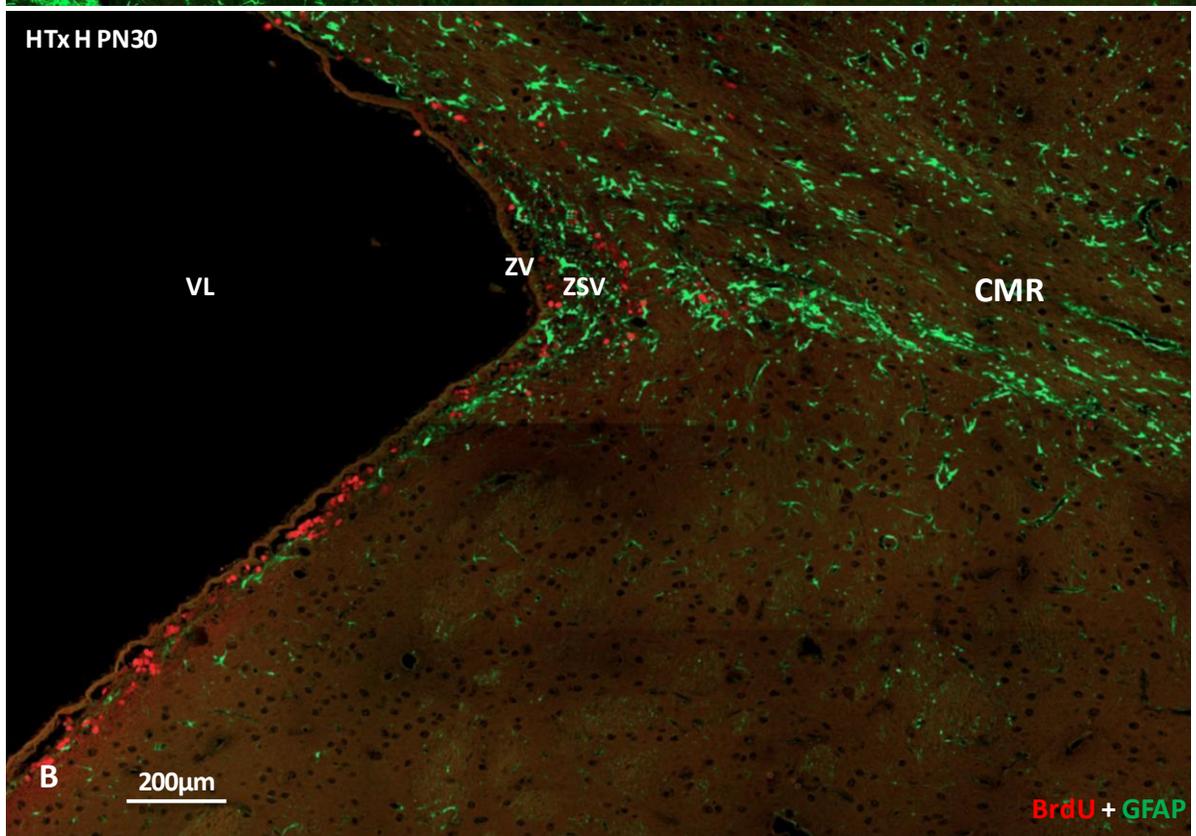
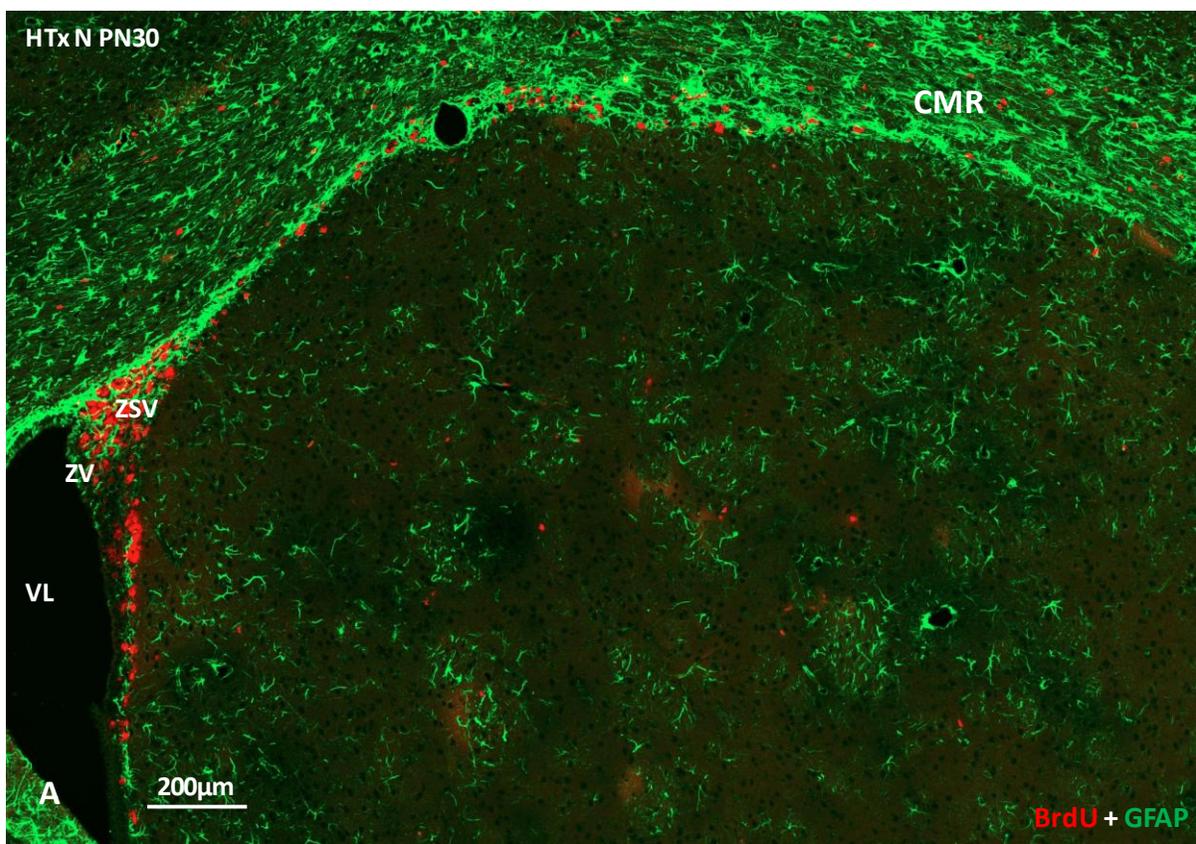


Figura 15. La conformación de las cadenas migratorias y de los túneles de astrocitos está alterada en hidrocefalia. Microscopía confocal. Fotografías panorámicas de secciones frontales de encéfalo de rata que muestran un VL de una rata normal y una hidrocefálica. Inmunofluorescencia doble anti-BrdU (rojo)/ anti-GFAP (verde). El Inmunomarcaje muestra las cadenas de células proliferando (BrdU en rojo) que con toda probabilidad corresponden a neuroblastos que migran a lo largo de los túneles de astrocitos marcados con GFAP (verde) en la ZSV y CMR. **A:** Corte frontal de cerebro de rata normal PN30. Se observa a nivel de la ZSV un gran número de células proliferando (BrdU + en rojo) que se presentan agrupadas dentro de túneles de astrocitos GFAP +. Las cadenas de neuroblastos se encuentran envainadas por células GFAP+. Abundantes células GFAP+ en la extensión de la ZSV hacia la CMR **B:** Corte frontal de cerebro de rata hidrocefálica PN30. Nótese la gran dilatación ventricular. A nivel de la ZSV cercana a la superficie ventricular células BrdU+ se observan dispersas y no ordenadas en cadenas como en la rata normal. Pocas células en relación al animal normal expresan GFAP. Existe una alteración en la conformación de los túneles de astrocitos. Pocos neuroblastos se observan a lo largo de la CMR. A nivel de la pared latero-ventral del VL se observan *cluster* o nidos de células proliferando.

La rata hidrocefálica muestra varias anormalidades tanto a nivel de la conformación de los túneles como de las cadenas migratorias de células BrdU+, estos resultados pueden verse en más detalle en la **Figura 16**. En el nicho de la ZSV a nivel de la Z2 (pared lateral) de la rata normal se observan pocas células proliferativas, en cambio en la rata hidrocefálica se encontró que las células BrdU positivas formaban *clusters* focalizados (nidos de neuroblastos) (**Figura 16B**). Tanto en la rata normal como hidrocefálica los *clusters* se encontraron rodeados por unos pocos astrocitos GFAP positivos (**Figura 16B**). En la **Figura 17** se muestran imágenes en detalle del nicho neurogénico presente en la Z1 de cada condición. Estas imágenes revelan importantes y claras diferencias. El nicho neurogénico normal está constituido por NSCs que proyectan su cilio sensor al LCR, estas NSCs corresponderían a astrocitos (Doetsch, 2003). Es posible visualizar reacción positiva para GFAP en la superficie ventricular (**Figura 17A, B**) pudiendo esto corresponder al cilio sensor de las NSCs presentes en la ZSV. Gran cantidad de astrocitos GFAP+ se encuentran constituyendo los túneles por los cuales viajan las células proliferativas (**Figura 17A, B**). En la rata hidrocefálica se observan varias diferencias respecto a la rata normal. El nicho neurogénico de la rata hidrocefálica presentó una baja cantidad de células con reacción positiva para GFAP a nivel de la ZV (**Figura 17C, D**). Pocos neuroblastos logran agruparse en cadenas, y una baja cantidad de astrocitos se encuentran en la zona neurogénica. Los astrocitos no se disponen en forma de túneles como en la rata normal (**Figura 17C, D**). Al analizar la conformación del nicho a nivel de la Z2 (pared lateral), en la rata normal se encontró que las células BrdU positivas formaban nidos de neuroblastos rodeados por unos pocos astrocitos GFAP positivos (**Figura 18A, C**). En la rata hidrocefálica estos nidos de células BrdU positivas fueron más evidentes y abundantes (**Figura 18**). Los nidos de neuroblastos en la rata hidrocefálica se orientan hacia el estriado en algunos casos (**Figura 18D**).

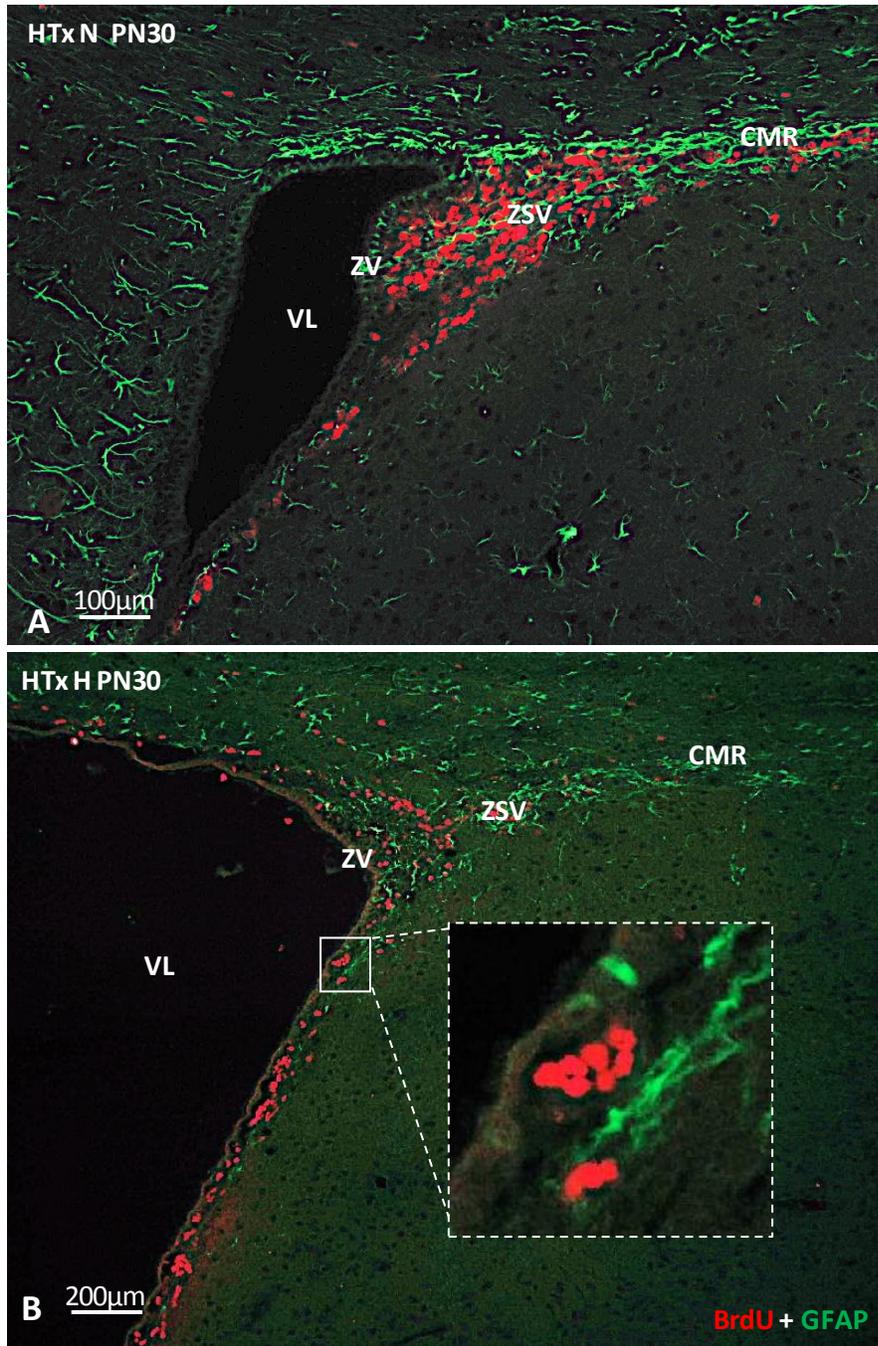


Figura 16. Detalle de la conformación de las cadenas de neuroblastos y los túneles de astrocitos en la ZSV y CMR del ventrículo lateral. Inmunofluorescencia doble anti-BrdU (rojo)/ anti-GFAP (verde). El inmunomarcaje muestra las cadenas de células proliferando (BrdU en rojo) que con toda probabilidad corresponden a neuroblastos que migran a lo largo de los túneles de astrocitos marcados con GFAP (verde) en la ZSV y CMR. **A:** Corte frontal de cerebro de rata normal PN30. Se observa la presencia de un gran número de células proliferando (BrdU + en rojo) con una correcta organización en cadenas que migran a través de túneles de astrocitos GFAP +. Las cadenas de neuroblastos se encuentran envainadas por células GFAP+. **B:** Corte frontal de cerebro de rata hidrocefálica PN30. Nótese la gran dilatación ventricular. Células BrdU+ se observan dispersas y no ordenadas en cadenas como en la rata normal. A nivel de la pared latero-ventral del VL se observan *cluster* o nidos de células proliferando como se muestra en el cuadrado en mayor aumento. El nicho neurogénico está desorganizado en hidrocefalia.

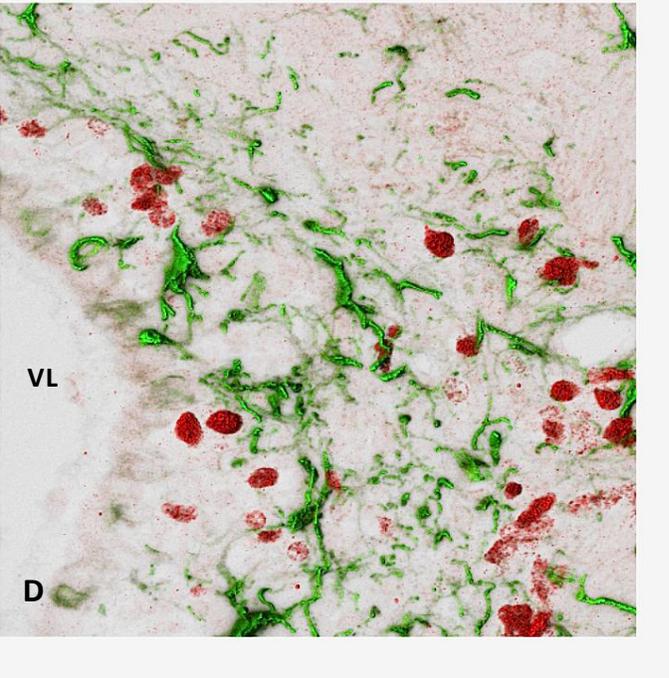
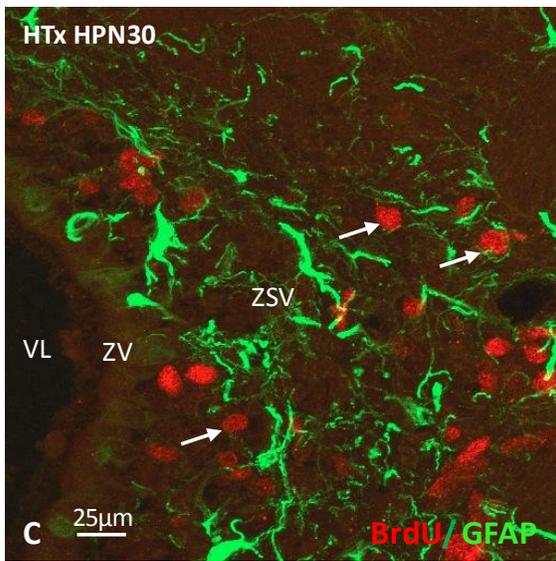
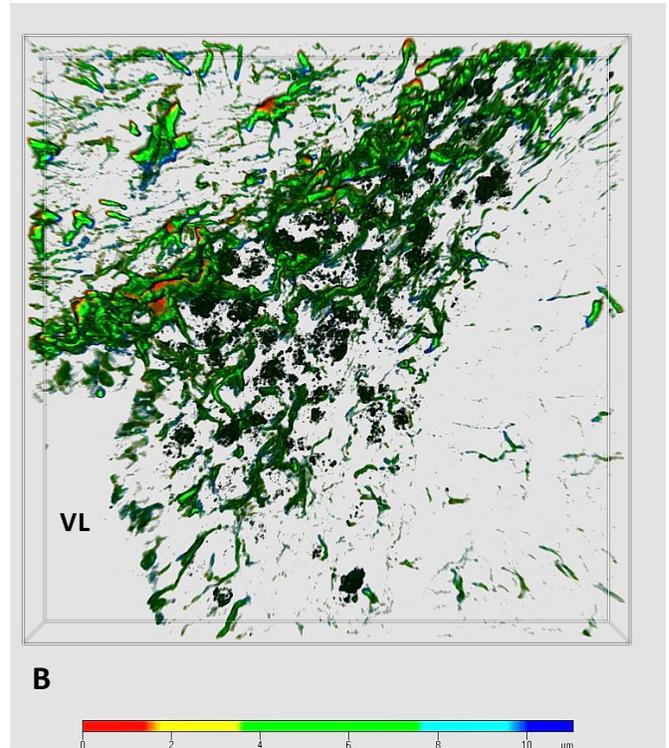
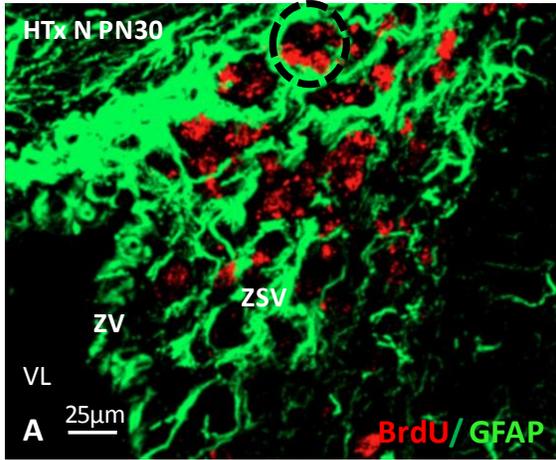


Figura 17. El nicho neurogénico de la ZSV esta alterado en la rata H-Tx hidrocefálica. Microscopía confocal. Inmunofluorescencia doble BrdU/GFAP. **A:** Detalle del nicho neurogénico de la ZSV de una rata H-Tx normal PN30. Se observa de manera clara la disposición de los astrocitos GFAP + (verde) envolviendo a las cadenas de células proliferativas (rojo). Los astrocitos generan verdaderos túneles (círculo) **B:** Reconstrucción en 3D del nicho neurogénico de una rata H-Tx normal, abundantes astrocitos conforman los túneles por los cuales se lleva a cabo la migración de neuroblastos. En A y B se destaca la presencia de reacción positiva para GFAP en la ZV. **C:** Detalle del nicho neurogénico de la ZSV de una rata H-Tx hidrocefálica PN30. Se observa la disposición de los astrocitos GFAP + (verde) sin conformar túneles. Las células BrdU+ no son capaces de formar cadenas migratorias, se presentan de manera aislada en la ZSV (flechas). **D:** Reconstrucción en 3D del nicho neurogénico de una rata H-Tx hidrocefálica. Pocos astrocitos se ubican en la zona del nicho neurogénico en la rata hidrocefálica.

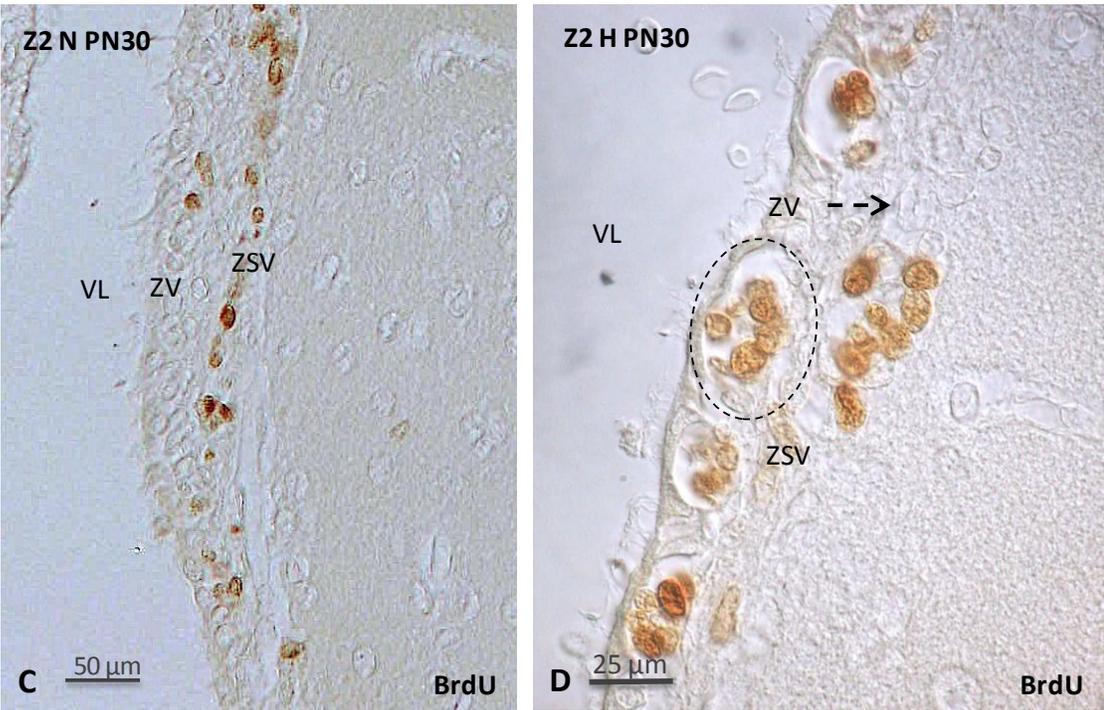
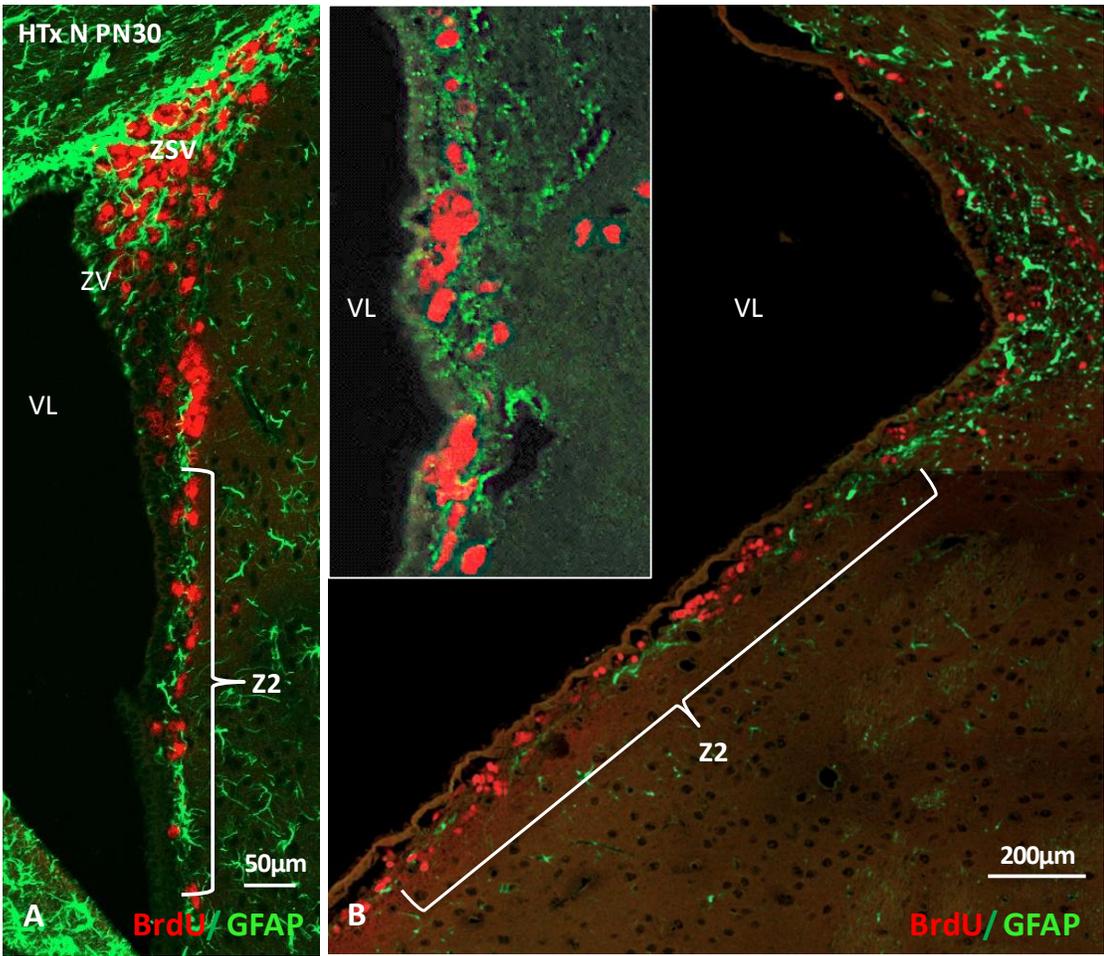


Figura 18. Nódulos de células proliferativas (neuroblastos) a nivel de la Z2 de animales hidrocefálicos PN30. **A:** Inmunofluorescencia doble anti BrdU (rojo)/ GFAP (verde). Se muestra una sección de la Z2 de una rata normal PN30. Se observan los *clusters* de células BrdU+ rodeados por células GFAP+ (astrocitos). **B:** Inmunofluorescencia BrdU/GFAP. Se muestra una sección de la Z2 de una rata hidrocefálica PN30. Se observa que el número de células proliferativas está altamente concentrada a nivel de la ZSV de la Z2. Estas células se encuentran conformando nódulos de células proliferativas (**recuadro**). **C:** Inmunocitoquímica anti-BrdU. Microscopía por contraste de interferencia diferencial (DIC) de Nomarsky. Se observan pocas células BrdU+ que ubicadas en la Z2 de una rata normal. **D:** Inmunocitoquímica anti-BrdU Microscopía por contraste de interferencia diferencial (DIC) de Nomarsky. Se observa una población heterogénea de células proliferativas en su mayoría agrupadas formando *clusters* dentro de unas “cavidades” (**círculo**) cerca de la superficie ventricular. Células proliferativas también se observan en la ZSV más alejada de la cavidad ventricular, orientadas hacia el estriado (**flecha discontinua**) Celulas endimarias multiciliadas se encuentran elongadas (ZV).

4.3.2 Los astrocitos de la ZSV expresan Cx43

Los astrocitos están unidos por uniones en hendidura (*gap junctions*), lo que les permite proporcionar una rápida propagación de señales dentro del nicho de las células madre (Doetsch, 2003). Por otra parte, se ha reportado que Cx43 es expresada en explantes de ZSV (Marins *et al.*, 2009). Considerando estos antecedentes, se realizó una inmufluorescencia doble anti BrdU/Cx43. El análisis inmunocitoquímico reveló que los astrocitos que forman los túneles por los que migran los neuroblastos en el nicho neurogénico y en la CMR expresan conexina 43 (**Figura 19A**). Concordante a lo observado con GFAP, en la rata normal se encontró una correcta organización de las células que expresan Cx43, envolviendo a las células proliferativas (BrdU+) (**Figura 19A**). En la Z1 de la rata hidrocefálica se observó que las células inmunopositivas para Cx43 se disponen formando una malla laxa que contiene unas pocas células BrdU+. En la zona correspondiente a la CMR las células Cx43 positivas no se organizaron formando túneles (**Figura 19B**).

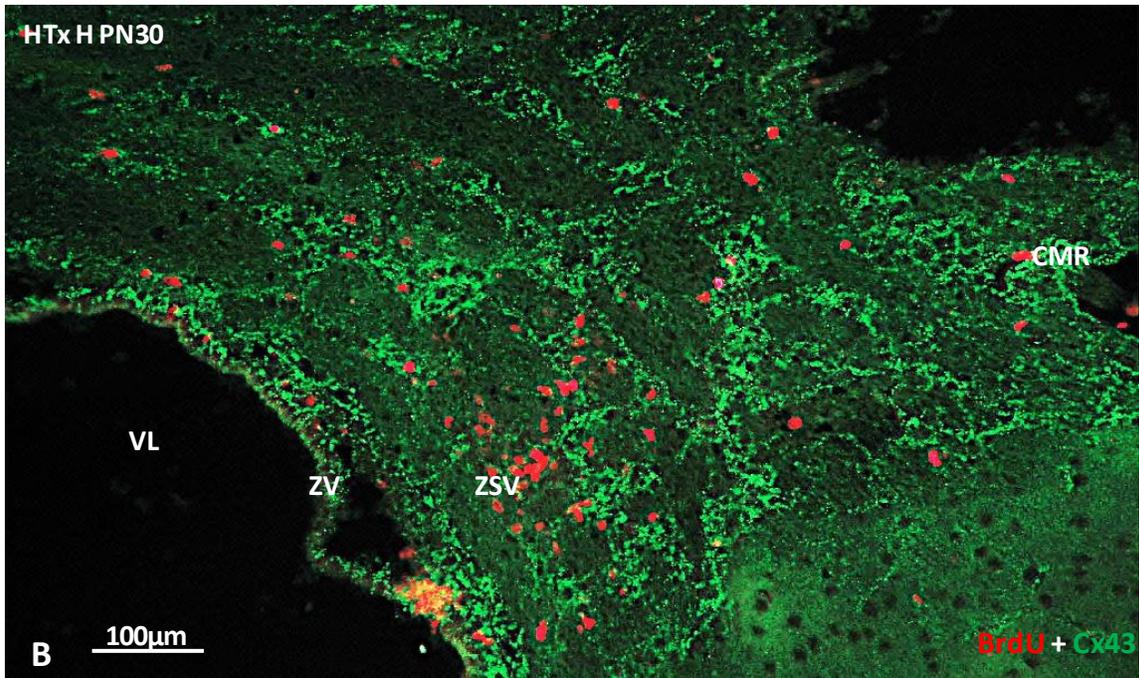
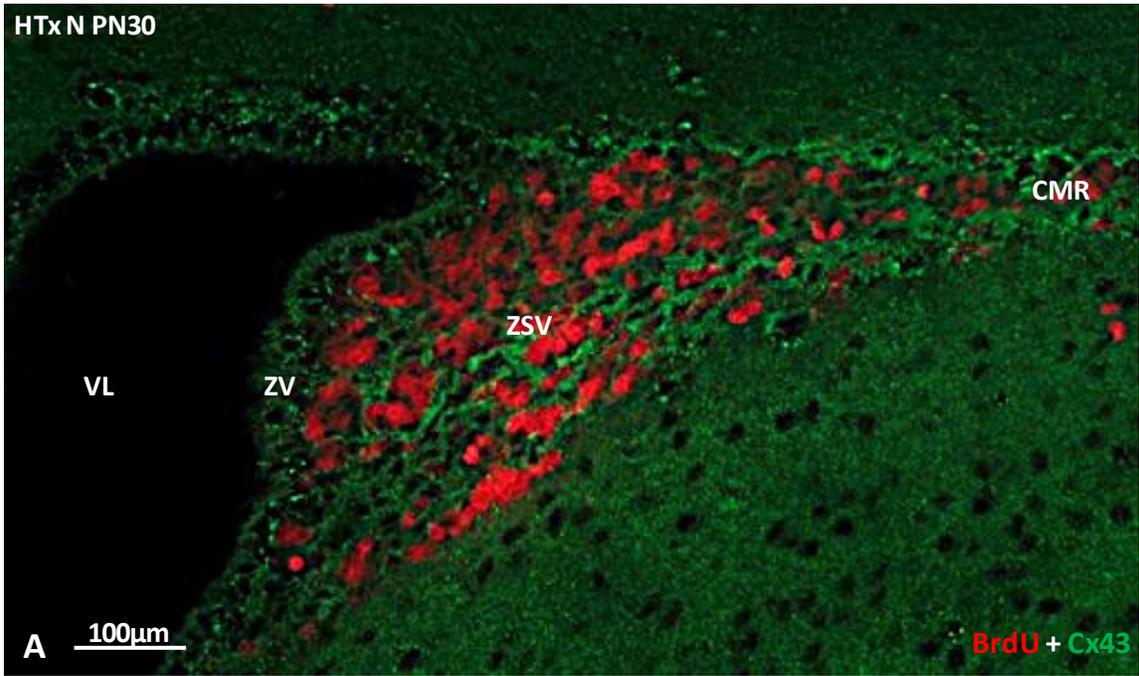


Figura 19. Los astrocitos que forman los túneles por los que migran los neuroblastos en el nicho neurogénico que se encuentra en la ZSV de los ventrículos laterales expresan conexina 43. Inmunofluorescencia doble anti BrdU (rojo)/ Cx-43 (verde). El inmunomarcaje muestra las cadenas de células proliferando (BrdU en rojo) que con toda probabilidad corresponden a neuroblastos que migran a lo largo de los túneles de astrocitos que expresan Cx43 (verde) en la ZSV y CMR. **A:** Corte frontal de cerebro de rata normal PN30. Se observa la presencia de un gran número de células proliferando (BrdU + en rojo) que migran a través de túneles de astrocitos que expresan Cx43. Se observa una organización de las cadenas de neuroblastos envainados por células Cx43 positivas (astrocitos). **B:** Corte frontal de cerebro de rata hidrocefálica PN30. Nótese la gran dilatación ventricular. Células BrdU+ se observan dispersas y no ordenadas en cadenas como en la rata normal. Se observan células BrdU+ individuales en la ZSV. El patrón de distribución de los astrocitos que expresan Cx43 está alterado en la rata hidrocefálica. El nicho neurogénico se observa desorganizado en hidrocefalia

4.4 Interpretación capítulo II: Desorganización del nicho neurogénico de la ZSV de la rata H-Tx hidrocefálica

El nicho neurogénico de la ZSV se caracteriza por presentar una organización de los neuroblastos generados en “cordones celulares” contenidos dentro de túneles de astrocitos (Alvarez-Buylla and García-Verdugo, 2002; Alvarez-Buylla and Lim, 2004). La organización del nicho además cuenta con células endimarias que separan a la ZSV de la cavidad ventricular, y con células progenitoras (células C) que se ubican distribuidas a lo largo de la red de cadenas de neuroblastos (Doetsch, 2003). Nuestros resultados de las inmunofluorescencias dobles BrdU/GFAP y BrdU/Cx43 del nicho neurogénico nos dan cuenta de la organización de los astrocitos (GFAP+ y Cx43+) y células proliferativas (BrdU+), los cuales arrojaron importantes diferencias entre la rata normal e hidrocefálica.

Se ha sugerido que el rol de los astrocitos, es modular la migración de los neuroblastos mediante la secreción de factores solubles que estimulan y conforman una barrera que evita que los neuroblastos abandonen la CMR e invadan el tejido nervioso adyacente, aislando estas células de la influencia química y eléctrica del parénquima circundante. (Doetsch *et al.*, 1997). En el presente trabajo se encontró una organización anómala de los astrocitos GFAP y Cx43 positivos en la ZSV de la Z1 y en la CMR de las ratas H-Tx hidrocefálicas (**Figura 14, 15 y 16**). Este hallazgo resulta relevante dado que una alteración en ellos afecta directamente la migración de los neuroblastos hacia el BO, lo cual podría estar causando a su vez la desorganización observada en la conformación de las cadenas de neuroblastos.

Los astrocitos están extensamente acoplados por *gap junctions*, lo que les permite proporcionar una rápida propagación de señales dentro del nicho de las células madre (Doetsch, 2003). Por lo

tanto, un correcto acoplamiento de los astrocitos en la ZSV permite un correcto funcionamiento del nicho neurogénico. Se ha demostrado que existe una expresión anómala de Cx43 en células que están a punto de someterse al denudamiento endimario (Sival *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2012), lo cual fue descrito por nuestro grupo, definiendo a la hidrocefalia como una patología de las uniones celulares de las NSCs, lo cual gatillaría hidrocefalia y una neurogénesis anormal (Rodríguez *et al.*, 2012). Sería importante estudiar en detalle, la localización subcelular de estas uniones celulares de los astrocitos de la ZSV formadas por Cx43.

Se ha descrito que los astrocitos que constituyen las células madre del nicho de la ZSV presentan una prolongación que alcanza el ventrículo cumpliendo funciones receptoras que sensan los componentes del LCR (Doetsch *et al.*, 1999). Por lo tanto, la organización de la ZSV está diseñada para recibir señales vía LCR. Numerosos compuestos presentes en el LCR podrían afectar la neurogénesis de la ZSV. Algunos de ellos son secretados por el OSC (OSC-espondina, TTR, FGFb), además de hormonas o factores de crecimiento. Como fue discutido en el capítulo I diversos estudios indican que las alteraciones en la composición del LCR hidrocefálico podrían interferir negativamente en el proceso neurogénico y gliogénico durante el desarrollo del cerebro fetal (Johanson y Jones, 2001; Mashayekhi *et al.*, 2002). Factores presentes en el LCR podrían estar causando esta desorganización que observamos en el nicho neurogénico de ratas hidrocefálicas adultas.

Otro aspecto importante a destacar, es la presencia de un mayor número de células proliferativas a nivel de la ZV (**Figura 13, capítulo I**). Si bien, este resultado fue presentado en el capítulo I como parte de las cuantificaciones de las células BrdU+, es relevante mencionarlo en este capítulo, dado que las células endimarias son un componente importante del nicho

neurogénico. Estas células se caracterizan por presentar una forma elongada en el animal hidrocefálico, esto puede ser causado como un mecanismo compensatorio al aumento del volumen ventricular. Un estudio realizado recientemente en el ratón *hyh* (Bátiz *et al.*, 2011) mostró que células endimarias podían nacer postnatalmente desde células nestina+ monociliadas en regiones discretas de las paredes ventriculares del cerebro. En este trabajo se concluyó que la endimogénesis postnatal se encontraba aumentada en el ratón *hyh*, proponiendo esto como un mecanismo adaptativo que opera en la hidrocefalia, junto con la elongación de las células endimarias, lo cual también podría explicar lo observado en la presente tesis en ratas H-Tx hidrocefálicas. Además se ha descrito que la pared dorsolateral de los VL tiene un potencial endimogénico que se activa durante el envejecimiento, o después del denudamiento endimario inducido por neuroaminidasa (Luo *et al.*, 2008). Esta reparación podría tener soporte en los astrocitos de la ZSV asociados al epéndimo, donde se describe que existe una inserción de astrocitos en el epéndimo, lo cual está asociado a la edad como una forma de reparación gatillada por el desgaste o deterioro de la superficie endimaria y/o por la expansión de los VL debido a la hidrocefalia relacionada con la edad (Luo *et al.*, 2008). Este mecanismo de reparación descrito por Luo *et al.*, (2008), también podría explicar lo que observamos en la rata H-Tx hidrocefálica, en donde las células que incorporan BrdU ubicadas en la ZV podrían corresponder a los astrocitos de la ZSV que están en división y que se inserten en el epéndimo estableciendo uniones adherentes con células endimarias vecinas y adquiriendo las características endimarias. Estudios futuros son necesarios para determinar la naturaleza de las células BrdU+ ubicadas en la ZV de animales hidrocefálicos.

4.5 Resultados Capítulo III: La corriente migratoria rostral se encuentra reducida y desorganizada en la rata H-Tx hidrocefálica

4.5.1 Caracterización de la CMR mediante inmunofluorescencia doble.

Considerando los hallazgos encontrados en la rata H-Tx hidrocefálica que involucran un mayor número de células con capacidad proliferativa en la Z2 que en la Z1 donde se localiza la CMR y la alteración de la organización del nicho neurogénico de la ZSV y de su extensión en la CMR, se realizó un estudio preliminar del proceso migratorio de los neuroblastos desde la CMR de la ZSV de los VL hacia el BO.

Analizando las inmunofluorescencia doble BrdU/GFAP e inmunohistoquímica con anti-BrdU realizadas en cortes frontales de ratas H-Tx normales de PN30, fue posible observar la CMR originada en Z1 (**Figura 20**). El análisis mediante el marcaje con BrdU reveló que en la rata normal las células BrdU⁺ forman cadenas dentro de la CMR (**Figura 20**). En cambio, en la rata hidrocefálica las células BrdU⁺ son escasas y dispersas dentro de una red laxa de células que expresa Cx43 y GFAP (**Figura 21**) Estos hallazgos sugieren que la CMR hacia el BO estaría afectada en la rata hidrocefálica y que el número de neuroblastos migratorios está drásticamente disminuido.

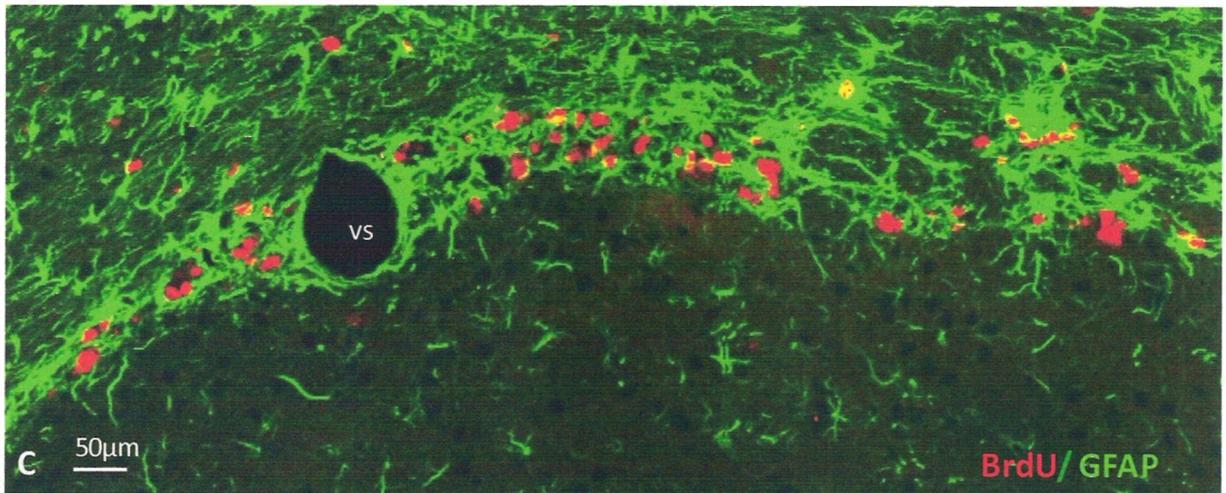
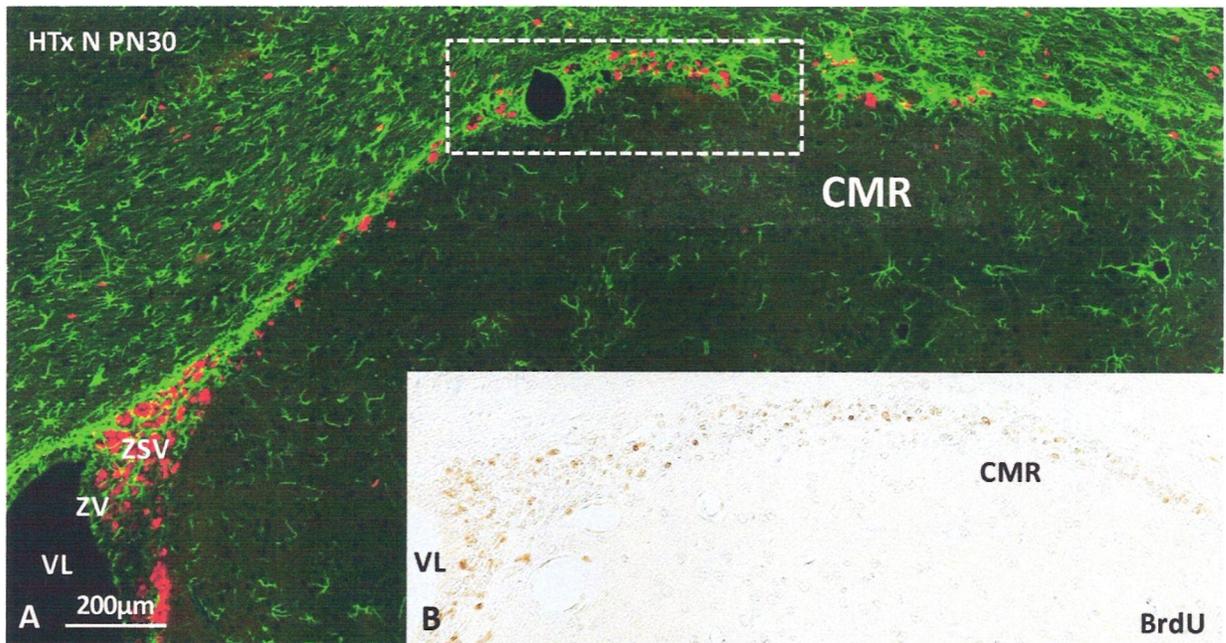


Figura 20. Detalle de la CMR de cortes frontales de encéfalo de ratas H-Tx normales PN30.

Microscopía confocal (inmunofluorescencia BrdU-GFAP), Microscopía por contraste de interferencia diferencial (DIC) de Nomarsky (campo claro Inmunocitoquímica anti-BrdU). **A:** Imagen panorámica de un VL de una rata normal H-Tx PN30, se muestra la organización de las cadenas de neuroblastos (rojo) a través de los túneles de astrocitos (verde) a nivel de la ZSV y la CMR **B:** Inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-BrdU, se muestran células inmunopositivas en la región de la CMR. La organización es clave para una buena migración en cadenas de neuroblastos **C:** Detalle del recuadro en A. Se observa en detalle la CMR en cortes frontales. En la rata normal la CMR es posible observar verdaderos túneles de astrocitos (GFAP+) por donde migran las células generadas en la ZSV (rojo) **D:** Inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-BrdU, se muestran células inmunopositivas conformando las cadenas de neuroblastos en la CMR (óvalo). Vasos sanguíneos (vs) se encuentran presentes como un componente importante en la migración de neuroblastos.

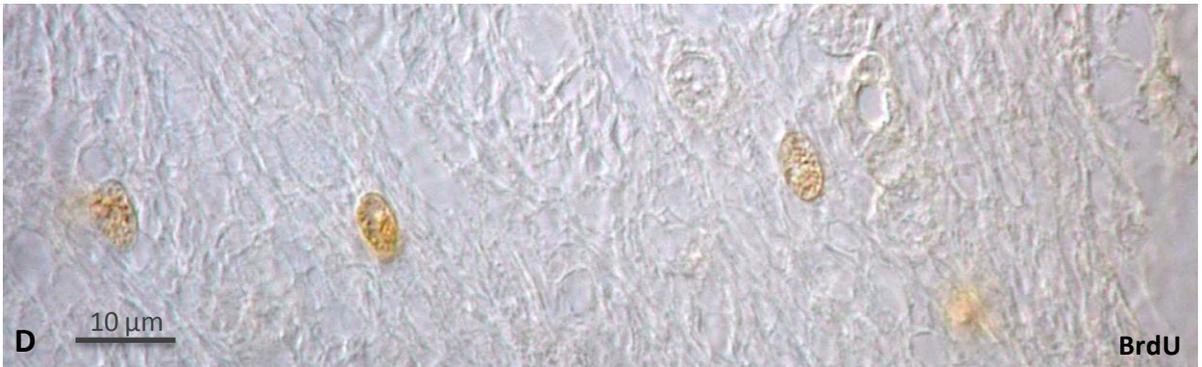
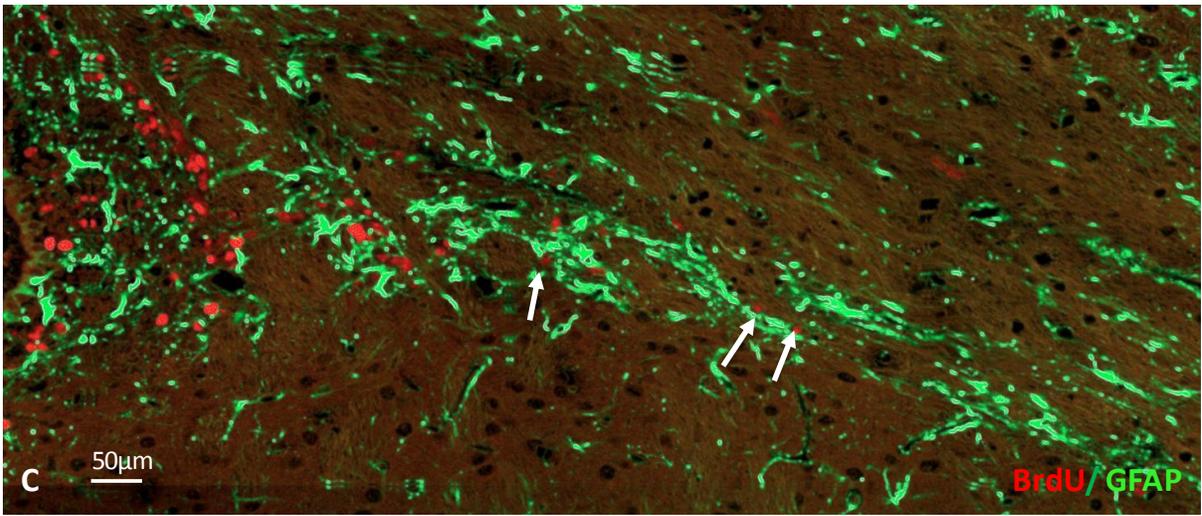
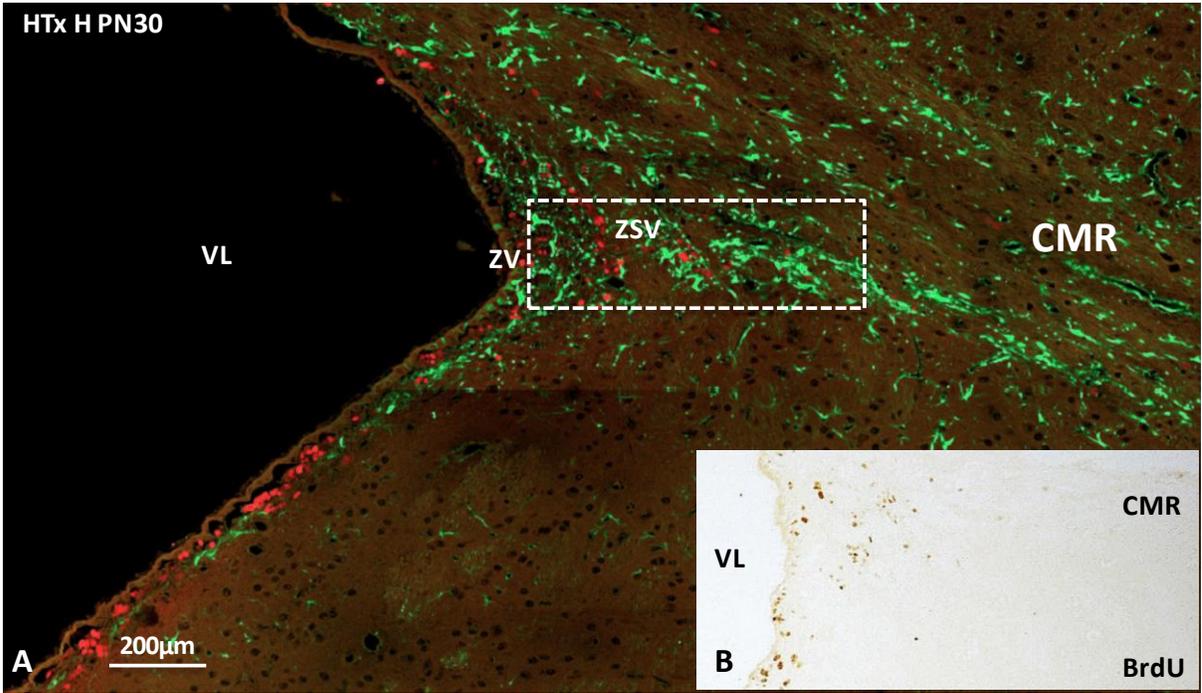


Figura 21. Detalle de la CMR de cortes frontales de encéfalo de ratas H-Tx hidrocefálicas PN30. Microscopía confocal (inmunofluorescencia BrdU-GFAP), Microscopía por contraste de interferencia diferencial (DIC) de Nomarsky (campo claro). **A:** Imagen panorámica de un VL de una rata hidrocefálica H-Tx PN30, se muestra que las células BrdU+ no son capaces de formar cadenas de neuroblastos (rojo) para migrar en la CMR, pocos astrocitos (verde) se encuentran en esta región **B:** Inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-BrdU, se muestran células inmunopositvas en la región de la CMR. Casi no hay neuroblastos BrdU+ en la CMR **C:** Detalle del recuadro en A. Se observa en detalle la CMR en cortes frontales. La rata hidrocefálica presenta la CMR alterada ya que los pocos astrocitos presentes en relación a la rata normal no conforman los túneles de astrocitos (GFAP+) por donde migran las células generadas en la ZSV (rojo). Las células BrdU+ se distribuyen de manera aislada (**flechas**). Células proliferativas escasas y dispersas dentro de una red laxa de células que expresan GFAP. **D:** Inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-BrdU, se muestran pocas células proliferativas aisladas que se ubican en la CMR.

4.5.2 Estudio de la CMR mediante H/E en cortes sagitales de ratas H-Tx PN30.

Cortes sagitales de ratas de PN30 teñidos con hematoxilina/eosina mostraron que bajo condiciones normales la CMR que se origina en la ZSV del VL se extiende hacia el BO, lo cual se ve representado por una gran densidad de células con núcleo pequeño y esféricos formando una corriente que llega a la zona central del bulbo (**Figura 22A**). En la rata hidrocefálica de PN30, la gran dilatación ventricular provoca que la ZSV de los VL sea más amplia y que la extensión en longitud de la corriente de neuroblastos migratorias hacia el BO sea más corta que en la rata normal (**Figura 22A y B**).

Un análisis cuantitativo preliminar (se estudiaron sólo dos ratas por condición) a nivel del BO mostró una reducción del número de neuroblastos en la rata hidrocefálica (**Figura 22B**).

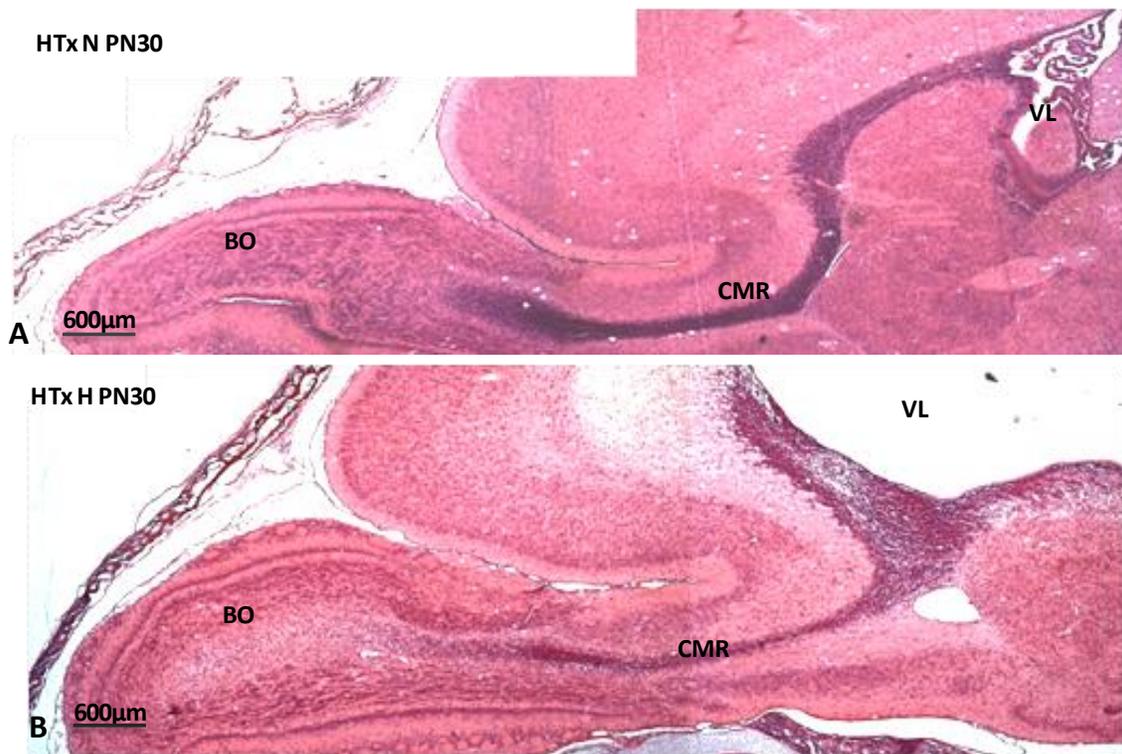


Figura 22. Corriente migratoria rostral en cortes sagitales de ratas H-Tx PN30 teñidos con H/E. A: Corte sagital de encéfalo de rata normal PN30. Se observa una gran cantidad de células con núcleos pequeños, esféricos y densos migrando por la CMR hacia el BO. Se observa la estructura del BO de forma alargada. **B:** Corte sagital de encéfalo de rata hidrocefálica PN30. Se observa una cantidad reducida de células con núcleos pequeños, esféricos y densos migrando por la CMR hacia el BO comparado con el animal normal. La gran dilatación ventricular hace que el camino de la CMR se acorte. La estructura del bulbo olfatorio se observa colapsada debido a la dilatación ventricular.

4.5.3 Estudio preliminar de la CMR en el BO de ratas H-Tx PN30

El BO es la estructura que constituye el principal destino de las células que se generan en el nicho neurogénico de la ZSV (Gritti *et al.*, 2002; Whitman y Greer, 2009). Al comparar el BO *in vivo* de ratas H-Tx de PN7 normal e hidrocefálica se encontró una reducción del tamaño del BO de la rata hidrocefálica (**figura 23A, B**). Este mismo hallazgo fue observado al comparar cortes frontales de BO teñidos con Hematoxilina/Eosina de regiones equivalentes de cerebro de ratas normales e hidrocefálicas. En estos cortes también se observó una notoria diferencia en la forma y tamaño de esta estructura (**Figura 23C, D**).

Como una primera aproximación para evaluar el proceso de migración de los neuroblastos generados en la ZSV hacia el BO, se realizaron estudios cuantitativos de células BrdU positivas que logran llegar al BO de ratas de PN30, que recibieron marcaje acumulativo de BrdU. Para este estudio se escogieron 3 cortes de zonas equivalentes de ratas normales e hidrocefálicas para realizar la cuantificación (n= 2 por condición). Este estudio reveló un menor número de células BrdU positivas en el BO de ratas hidrocefálicas (**Figura 24**). A pesar de que el bajo número de ratas no nos permitió realizar un estudio estadístico, estos resultados sugieren fuertemente una alteración del proceso de migración rostral en la rata hidrocefálica H-Tx

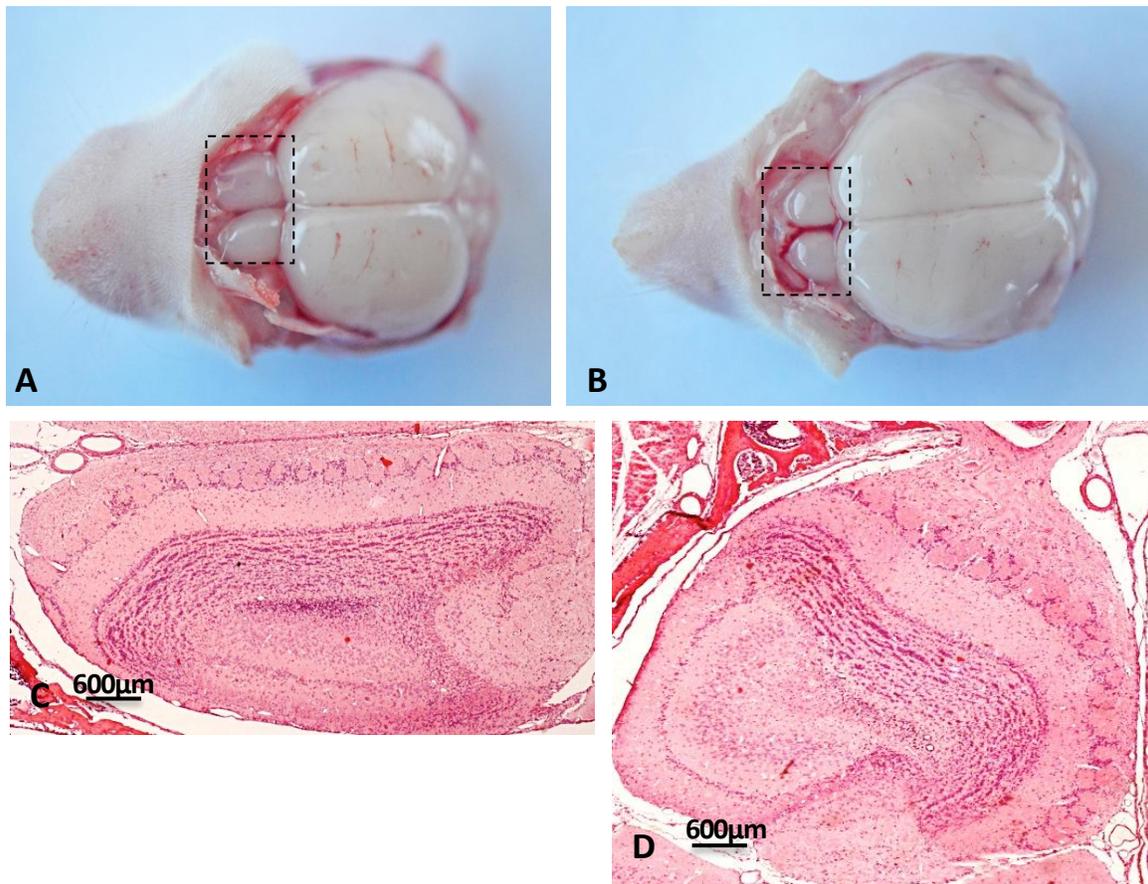


Figura 23. Bulbo olfatorio de ratas H-Tx. **A.** Vista dorsal de cerebro de rata H-Tx normal PN7. **B.** Vista dorsal de cerebro de rata H-Tx hidrocefálica PN7. Nótese la diferencia en el tamaño del BO (**recuadro en A y B**). **C.** Hematoxilina- eosina de un corte frontal de BO de una rata normal PN30. **D.** Hematoxilina- eosina de un corte frontal de BO de una rata hidrocefálica PN30. Se destaca la notoria diferencia en la forma y tamaño entre el BO normal e hidrocefálico.

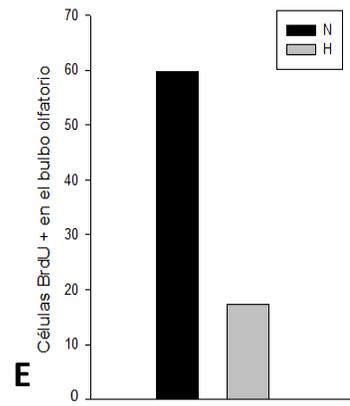
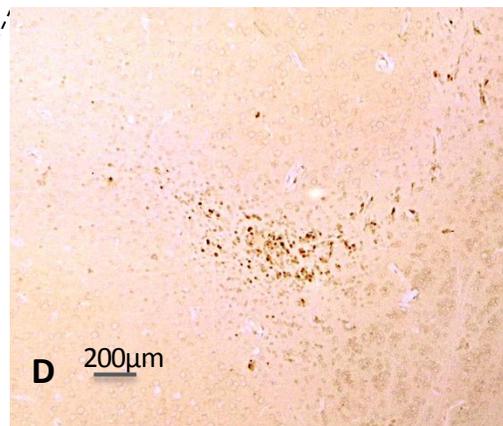
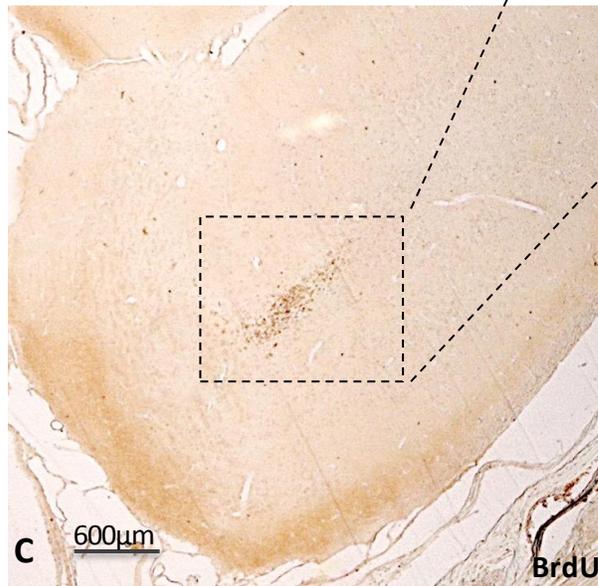
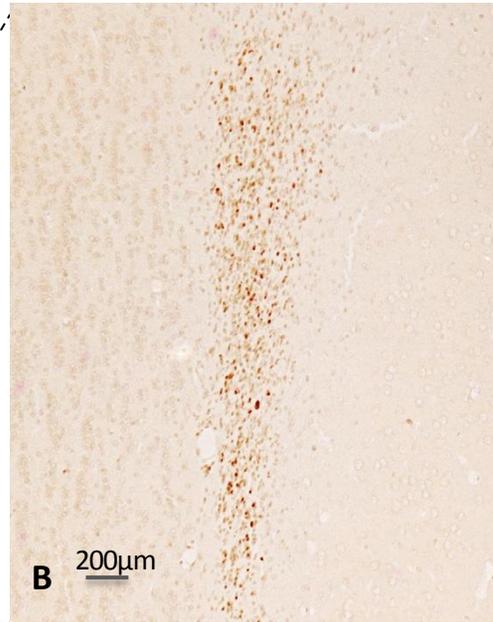
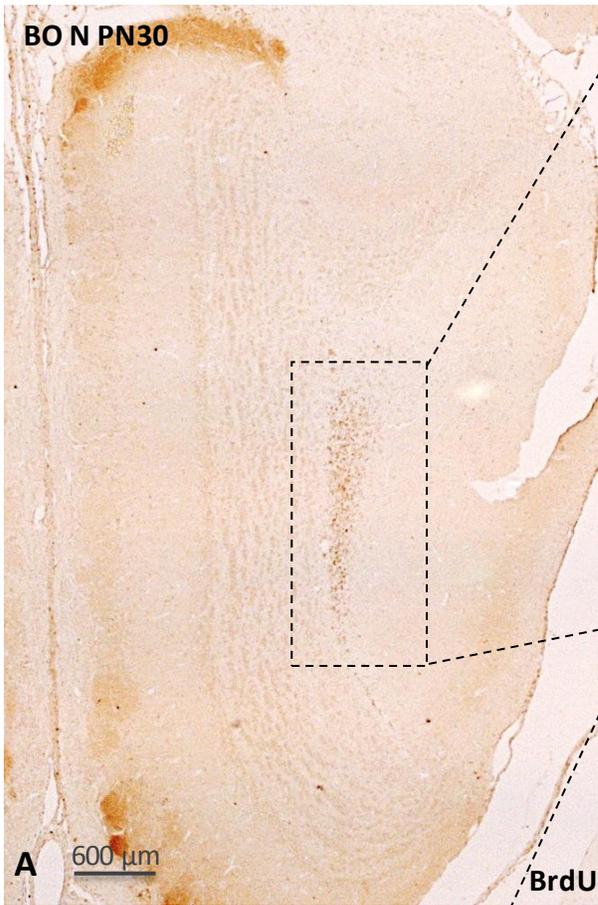


Figura 24. Análisis cuantitativo de las células BrdU+ en el bulbo olfatorio. Inmunocitoquímica anti-BrdU. **A.** Sección frontal de BO de rata normal PN30. **B.** Detalle de la zona de llegada de células BrdU +, aumento del recuadro en A. **C.** Sección frontal de BO de rata hidrocefálica PN30. **D.** Detalle de la zona de llegada de células BrdU +, aumento del recuadro en C. **E.** Cuantificación de células BrdU+ en BO (n= 2 animales por condición).

4.6 Interpretación capítulo III: La corriente migratoria rostral se encuentra reducida y desorganizada en la rata H-Tx hidrocefálica

Los astrocitos GFAP+ y Cx43+ que conforman los túneles por los que se lleva a cabo la migración en cadena de neuroblastos, mostraron alteraciones en su organización en ratas H-Tx hidrocefálicas. Los astrocitos son el andamiaje de la migración de neuroblastos a lo largo de la CMR. Una alteración en ellos afectaría la migración de neuroblastos hacia el BO.

En fetos humanos con hidrocefalia y espina bífida se ha observado que la expresión de proteínas que forman uniones comunicantes (*gap junctions*) en el neuroepitelio/epéndimo que tapiza el acueducto cerebral se encuentran alterados. Una de ellas es Cx43 cuya alteración en su expresión conlleva a una falla en el batido ciliar y por tanto en la circulación del LCR, generando turbulencias a lo largo de su trayecto (Sival *et al.*, 2010). A este antecedente se suma lo observado por Sawamoto *et al.*, (2006) quienes observaron que el flujo del LCR en el nicho neurogénico es fundamental para la orientación de la migración de los neuroblastos, y atribuyen una función importante al batido ciliar para la formación de un gradiente de concentración de moléculas que participarían en la correcta orientación y migración de los neuroblastos. Defectos en el flujo y composición del LCR en hidrocefalia podrían estar afectando la CMR en ratas H-Tx hidrocefálicas, la cual con toda probabilidad se encuentra alterada, ya que las evidencias expuestas en esta tesis lo sugieren fuertemente, debido a las anomalías en la organización de la CMR y a los resultados preliminares obtenidos en BO.

Para mantener y guiar la migración de neuroblastos en el cerebro adulto se requieren de un patrón coordinado de interacciones entre señales de la matriz extracelular, que secreta señales de dirección, moléculas de adhesión celular, y receptores de señalización celular de superficie

(integrina y tirosina quinasa). Una señal esencial para la organización de las cadenas de migración de neuroblastos en la CMR es la PSA-NCAM (Ghashghaei *et al.*, 2007). Sería interesante evaluar la expresión de PSA- NCAM, ya que los neuroblastos en la rata hidrocefálica a nivel de ZSV de la Z1 y la CMR se encuentran en su mayoría aislados sin formar cadenas como en el animal normal.

5 DISCUSION GENERAL

5.1 Las ratas H-Tx hidrocefálicas presentan una alteración de la neurogénesis postnatal que implica un cambio en la distribución de las células troncales neurales/progenitores neurales de la ZSV

Una alteración primaria del neuroepitelio/epéndimo que ocurre en algunos modelos animales y en humanos, puede conducir tanto a hidrocefalia como a trastornos de la neurogénesis, dependiendo si se produce en el AS o en el ZV del *pallium* (Wagner et al., 2003; Ferland et al., 2009; Rodríguez et al., 2012).

En fetos humanos con hidrocefalia y espina bífida se ha observado que la expresión de proteínas que forman uniones comunicantes (*gap junctions*) en el neuroepitelio/epéndimo que tapiza el acueducto cerebral se encuentran alterados. Una de ellas es Cx43 cuya alteración en su expresión conlleva a una falla en el batido ciliar y por tanto en la circulación del LCR, generando turbulencias a lo largo de su trayecto (Sival et al., 2010). Los hallazgos obtenidos en la presente tesis mostraron una alteración en la distribución de las células proliferativas a nivel de la ZSV de los VL, destacando una drástica disminución a nivel de la Z1 y un incremento a nivel de la Z2 en ratas hidrocefálicas.

Jiménez y colaboradores (2009) mostraron que en el ratón *hyh* la neurogénesis postnatal se encuentra disminuida debido al denudamiento del neuroepitelio/epéndimo que se produce en el nicho neurogénico, siendo este un componente importante para el nicho. En la rata H-Tx el denudamiento de la ZV en el telencéfalo sigue un patrón excepcional: se inicia como un foco pequeño de disrupción que progresa radialmente, convirtiéndose en un foco redondo grande de ZV desorganizada; varios focos en diferentes estados de progresión de la disrupción coexisten, este denudamiento se circunscribe al techo (*pallium*) de los VL (Ortloff, 2008) sin alcanzar la

zona del nicho neurogénico que está en la pared lateral de los VL. Por lo tanto, las alteraciones de la ZSV observadas en la presente tesis no pueden ser atribuidas a la ausencia del componente endimario, como si ocurre en el ratón *hyh*. Una explicación en el cambio de la distribución de las células con capacidad proliferativa podría deberse a alteraciones en la composición del LCR. El LCR juega un papel fundamental en la integración de las funciones del SNC. Según Mashayekhi *et al.*, (2002), el LCR puede contener factores que estimulan la proliferación y diferenciación celular, compuestos inhibitorios y otras “señales” requeridas para una actividad normal de la capa germinal del cerebro en desarrollo, de esta forma, la acumulación o desequilibrio de estos compuestos puede inhibir la actividad proliferativa y/o alterar el destino de las células progenitoras.

La idea de que la composición del LCR hidrocefálico influye negativamente en la neurogénesis postnatal llevando a un cambio en la distribución de la células BrdU positivas en la ZSV, se encuentra apoyados en los siguientes hechos: i) hay cambios en la composición proteica del LCR de la rata hidrocefálicas H-Tx, que implican el aumento de algunas proteínas (transtirretina) y la disminución de otras (Jaramillo, 2009), ii) hay una alteración en el flujo normal del LCR por la estenosis del AS, lo que se demostró por la falta de circulación de peroxidasa inyectada en el VL (Ortloff, 2008). , iii) LCR obtenido de fetos hidrocefálicos H-Tx tiene un efecto inhibitorio sobre la capacidad proliferativa de células corticales normales (Mashayekhi *et al.*, 2002). A estos antecedentes se suma los hallazgos realizados por Sawamoto *et al.*, (2006) quienes observaron que el flujo del LCR en el nicho neurogénico es fundamental para la orientación de la migración de los neuroblastos, y atribuyen una función importante al batido ciliar para la formación de un gradiente de concentración de moléculas que participarían en la correcta orientación y migración de los neuroblastos.

La disminución de las células BrdU positivas en la Z1 y el aumento de estas en la Z2 de la ZSV de las ratas hidrocefálicas H-Tx también podría deberse a factores liberados durante un proceso inflamatorio. Una de las principales lesiones asociadas a la hidrocefalia congénita, tal vez la más importante por las consecuencias que provoca, es el daño y reducción en el tamaño cortical, que implicaría reducción en el número y funcionalidad neuronal (Boillat *et al.*, 1997). Dentro de estos daños también se han descrito, cavitaciones o pérdida de la sustancia blanca e infiltrado macrofágico/microglial en la región dañada (Ulfig *et al.*, 2004). Se ha demostrado que las citoquinas secretadas por los macrófagos pueden afectar la neurogliogénesis y angiogénesis (Elkabes *et al.*, 1996), además de las quimiocinas clásicas, los macrófagos/microglia activados secretan VEGF el cual tiene propiedades neurogénicas, angiogénicas y quimioatrayentes (Young *et al.*, 2011). Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio han mostrado un aumento de células IBA1 positivas (que reconoce microglia activada y macrófagos) en ratas hidrocefálicas en estadios postnatales tempranos (PN1 y 7). Es importante señalar que estas células se encuentran localizadas cercanas a la ZSV de los animales hidrocefálicos, incluso en la cavidad ventricular asociadas a las células ependimarias de la ZV. En estos mismos estudios se ha observado el aumento de IL6, de los receptores Toll 4 y del factor IRF7 en los animales hidrocefálicos, sugiriendo fuertemente la existencia de un proceso inflamatorio en la rata hidrocefálica H-Tx (Tesis Paulina Araya, en ejecución). En la Tesis doctoral de Alexander Ortloff, 2008, se mostró que en la etapa inicial de la disrupción de la ZV algunas células neuroepiteliales del *pallium* exhiben anomalías en su superficie, las cuales estimulan la interacción con macrófagos ventriculares, posteriormente estas células se desprenden y dejan expuestas a las células de la ZSV. Es importante destacar que en esta etapa también existe una gran cantidad de macrófagos en la ZSV dorsal. Sorprendentemente en este caso las células que dibujan el “triángulo”

característico del animal normal son los macrófagos. Por lo tanto, los macrófagos se ubicarían en la ZSV desde donde se origina la CMR (Z1).

En la región del nicho neurogénico nunca hay disrupción de la ZV, ésta ocurre en el *pallium* de los VL, dejando en contacto las células de la ZSV con el LCR, esto permitiría que los macrófagos además de interactuar con NSCs interactúen con NPCs en la etapa embrionaria. Si consideramos que los macrófagos presentan “memoria” y que fueron sensibilizados al interactuar con NSCs y NPCs, y que este sistema continúa funcionando en etapas adultas, en el único lugar donde van a encontrar estos tipos celulares es en la ZSV. Si en la etapa de desarrollo de la disrupción de la ZV (entre E19 y PN7) los macrófagos jugarían un rol en el *inicio* de la disrupción, en la etapa adulta postnatal, estos mismos macrófagos sensibilizados podrían inducir la “disrupción” de la ZSV, de la Z1 en particular. Ello explicaría la ubicación selectiva de macrófagos en la ZSV de ratas hidrocefálicas adultas. Una posible explicación de por qué los macrófagos se ubican en esta región podría corresponder a que en esa región algunas células sufran apoptosis, ya que se sospecha de señales quimiotácticas que son liberadas cuando las neuronas, células de la glía y ependimarias mueren.

Considerando estos antecedentes no se puede descartar la posibilidad de que dicho proceso inflamatorio puede estar implicado en la disminución del número de células que proliferan a nivel de la Zona 1.

5.2. La hidrocefalia afecta la organización del nicho neurogénico de la ZSV.

El cerebro de mamíferos adultos posee NSCs multipotentes, las cuales residen y participan en nichos especializados que sostienen el autorenovamiento y la diferenciación (Álvarez –Buylla and Lim, 2004). El nicho neurogénico de la ZSV se organiza en cadenas de neuroblastos que

están rodeadas por células tipo B las cuales tienen características de astrocitos y forman estructuras tubulares. Grupos de células C o células progenitoras están asociadas a las cadenas de neuroblastos. Las células ependimarias forman una lámina continua de células que separa la ZSV del VL. Las células B (astrocitos) originan a las células C (progenitores) las que finalmente generan células A (neuroblastos) (Álvarez- Buylla and García-Verdugo, 2002). Toda esta organización está gobernada por una serie de señales que conforman un “microambiente” especial, las cuales están dadas por factores solubles y la composición de la matriz extracelular, por señales que se transmiten a través de interacciones célula-célula, la vasculatura, factores de crecimiento y componentes del LCR (Doetsch, 2003; González, 2007). Normalmente las células GFAP positivas que contactan el ventrículo (NSC) son escasas. Se ha descrito que la prolongación que alcanza el ventrículo posee un cilio único que carece del par de microtúbulos centrales, siendo inmóviles y cumplen funciones receptoras que censan los componentes del LCR (Doetsch *et al.*, 1999) En la presente tesis se encontró que la organización del nicho neurogénico de la ZSV se encuentran alterada en ratas H-Tx.hidrocefálicas. Esta desorganización incluye una alteración en la conformación de los túneles de astrocitos, a diferencia de lo observado en el animal normal donde se distingue la conformación de estas células formando verdaderos túneles que envainan cadenas de neuroblastos. Otro aspecto que destaca en el animal hidrocefálico, es que pocas células BrdU+ (neuroblastos) logran conformar “cadenas” o grupos de células en la extensión de la ZSV, sino que se disponen de manera aislada. Las pocas cadenas que se forman en la rata hidrocefálica es posible observarlas en la cercanía del espacio ventricular. Esta alteración observada en el nicho neurógeno podría ser causada por los macrófagos sensibilizados en la etapa embrionaria, como se mencionó en la sección anterior.

Importante fue encontrar abundantes células formando “*clusters*” de neuroblastos a nivel subependimario de la pared ventral del VL (Z2) de las ratas hidrocefálicas. La organización de los *clusters* de neuroblastos a nivel de la Z2 también se ha observado en otras condiciones, donde se describe un cambio en la migración de los neuroblastos hacia zonas de daño cerebral como el estriado (Baker *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2006). Este aumento de células proliferativas a nivel de la Z2 podría deberse, a que estas células estarían migrando hacia las regiones lesionadas presentes en los cerebros de ratas hidrocefálicas, y así contribuir a su reparación. Esto podría ser estudiado en futuras investigaciones, utilizando protocolos de inyección de BrdU por períodos más largos, lo que permitiría observar el destino de las células generadas en la Z2.

5.3 La alteración de la CMR en la rata hidrocefálica, implica una menor llegada de neuroblastos al bulbo olfatorio.

Los tubos gliales que envainan a los neuroblastos migratorios son un andamiaje para esta migración que es distinta a la migración radial y a la tangencial. Además se les atribuye un rol en modular el estado migratorio y mitótico de los neuroblastos dentro de CMR, a través de interacciones célula – célula, y por la secreción de proteínas que tendrían la actividad de favorecer la migración (MIA) (Ghashghaei *et al.*, 2007).

Una señal esencial para la organización de las cadenas de migración de neuroblastos en la CMR se ha establecido que sería la molécula PSA-NCAM (Ghashghaei *et al.*, 2007). Sería interesante evaluar la expresión de esta molécula, ya que en ratas hidrocefálicas se observó que pocas células proliferativas serían capaces de formar cadenas y se presentaban aisladas en una superficie laxa de la ZSV.

La explicación más potente de la alteración que observamos en el nicho neurogénico puede corresponder al hecho de que los macrófagos sólo se encuentran en el “triángulo” donde hay neurogénesis postnatal, tal como se discutió en la sección anterior. Los macrófagos parecen estar ligados al *inicio* de la disrupción de la ZV, este mismo sistema probablemente estaría ocurriendo en la ZSV, por lo tanto, estarían realizando un trabajo no correctivo, causando una disrupción de la ZSV, lo que se refleja en las alteraciones observadas en la Z1.

Hay evidencias que la ZSV es una fuente importante de neuroblastos que migran hacia regiones lesionadas del cerebro. Luego de un infarto cerebral por isquemia cerebral (modelo de oclusión de la arteria cerebral media, MCAO) en la cual ellos se diferencian en neuronas maduras en el estriado (Yamashita *et al.*, 2006). Sin embargo, no está claro qué tipo neuronal es generado y además el número de neuronas que recuperaría las funciones neurológicas sería pequeño. Esta migración lateral se estaría llevando a cabo a través de vasos sanguíneos desde la ZSV hacia las regiones isquémicas en el estriado. Se considera que los vasos sanguíneos jugarían un rol crucial en la sobrevivencia de los neuroblastos y/o migración de estos, por la liberación de factores difusibles, tal como BDNF, el cual se conoce que promueve la proliferación (Kojima *et al.*, 2010; Yamashita *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2011). Proteínas de la MEC asociadas a vasos sanguíneos tales como la laminina serían importante para mantener a los precursores neurales (Young *et al.*, 2011). Considerando estos antecedentes se podría pensar que el aumento de células BrdU positivas en la Z2 de la ZSV de la rata hidrocefálica podría deberse a una reorientación de los neuroblastos con la finalidad de llevarlos a los lugares de lesión localizados cerca de la pared lateral de los ventrículos de la rata hidrocefálica. La evidencia preliminar obtenida en esta tesis, que muestra la presencia de neuroblastos en el espacio perivascular de vasos próximos a la Z2, apoyan esta posibilidad (**Figura 25**).



Figura 25. Células proliferativas ubicadas en el espacio perivascular en la ZSV de la Z2 de los VL de una rata H-Tx hidrocefálica PN30. Inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-BrdU. Microscopía por contraste de interferencia diferencial (DIC) de Nomarsky. Se observa la ZV y la ZSV bien delimitadas. Presencia de células BrdU+ en la ZSV destacando su ubicación en el espacio perivascular (flechas). Vs: vaso sanguíneo.

Existen evidencias que precursores neurales podrían migrar a través de fibras mielínicas y procesos astrogiales hacia los sitios de daño, utilizando señales tales como SDF1 α . Estos factores serían liberados por neuronas o glía localizadas en los sitios dañados o por expresión de metaloproteinasas de la matriz (por ejemplo, MMP9) que modularían componentes de la MEC del cerebro en el camino de la migración (Ghashghaei *et al.*, 2007; Okano y Sawamoto, 2008).

No se puede descartar la posibilidad de que los neuroblastos “migren” anómalamente al LCR a través del epéndimo. Esta posibilidad podría ser investigada recolectando LCR de ratas adultas hidrocefálicas y utilizarlo para cultivo celular, evaluando la formación de neuroesferas. De este modo se podría corroborar la posibilidad de encontrar células con capacidad proliferativas libres en el LCR. Estudios recientes de nuestro laboratorio han mostrado la presencia de células con capacidad proliferativa en muestras de LCR de ratas H-Tx hidrocefálicas de PN1. Interesantes serían estos resultados, si pensamos que en el humano se presenta la hidrocefalia normotensiva o hidrocefalia crónica del adulto. Se podría pensar en la posibilidad de encontrar en el LCR de humanos adultos NSCs y NPCs, que nos permitirían investigar probables alteraciones de la neurogénesis postnatal y a la vez servir como un método diagnóstico de esta enfermedad.

En la presente tesis se aportó evidencia de que en la rata H-Tx se altera: i) la distribución de las precursores neurales en el nicho neurogénico de la pared del VL, ii) la organización del nicho neurogénico y, iii) la organización de la CMR, lo cual resultaría en una drástica reducción de los neuroblastos que arriban al BO.

Un claro entendimiento de los mecanismos involucrados en la alteración de la neurogénesis postnatal en la hidrocefalia es crítico para mejorar opciones diagnósticas y terapéuticas.

6 CONCLUSIONES

1. La proliferación de NPCs está drásticamente reducida en la Z1 e incrementada en la Z2.
2. El nicho neurogénico se encuentra desorganizado.
3. No existe migración de precursores proliferativos desde la Z2 a la Z1.
4. La migración de neuroblastos por la CMR no está organizada en tubos de astrocitos.
5. El número de neuroblastos que migran por la CMR y que llegan al BO está drásticamente disminuido.
6. La proliferación de células en la ZV en ratas hidrocefálicas sugiere que: (i) NSCs continúan presentes en la capa endimaria; (ii) hay proliferación de células endimarias.

7 Bibliografía

- Abrous, G.N. Kohel, M. Le Moal, M. (2005). Adult Neurogenesis: From Precursors to Network and Physiolog. *Physiol Rev* 85: 523–569.
- Alvarez-buylla, A., & García-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in Adult Subventricular Zone, 22(3), 629–634.
- Alvarez-Buylla, A., & Lim, D. a. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, 41(5), 683–6.
- Biebl M., Cooper C.M., Winkler J., Kuhn H.G. (2000). Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett.* ; 291:17–20.
- Bagley, J., LaRocca, G., Jimenez, D. a, & Urban, N. N. (2007). Adult neurogenesis and specific replacement of interneuron subtypes in the mouse main olfactory bulb. *BMC neuroscience*, 8, 92.
- Bátiz, L. F., Jiménez, A. J., Guerra, M., Rodríguez-Pérez, L. M., Toledo, C. D., Vio, K., Páez, P., et al. (2011). New ependymal cells are born postnatally in two discrete regions of the mouse brain and support ventricular enlargement in hydrocephalus. *Acta neuropathologica*, 121(6), 721–35
- Baker, K. L., Daniels, S. B., Lenington, J. B., Lardaro, T., Czap, A., Notti, R. Q., Cooper, O., et al. (2006). Neuroblast Protuberances in the Subventricular Zone of the Regenerative MRL / MpJ Mouse, 761(August 2005), 747–761.

- Boillat CA, HC Jones, GL Kaiser, NG Harris. (1997). Ultrastructural changes in the deep cortical cells of infant rats with inherited hydrocephalus and the effect of shunt treatment. *Exp Neurol.*; 147, 377-388.
- Brazel, C. Y., Romanko, M. J., Rothstein, R. P., & Levison, S. W. (2003). Roles of the mammalian subventricular zone in brain development. *Progress in Neurobiology*, 69(1), 49–69.
- Bruni J. E., M. R. Del Bigio. (1997). Hydrocephalus. En: Dulbecco R (ed). *Encyclopedia of Human Biology*: 645-651. 2^o Edition, Academic Press, San Diego.
- Chenn A, Walsh C. A. (2002). Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science.*;297:365–369.
- Chojnacki AK, Mak GK, Weiss S. (2009). Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? *Nat Rev Neurosci*; 10:153-63
- Dandy DE. (1919). Experimental hydrocephalus. *Ann Surg* 70, 129-142.
- Del Bigio MR. (2001). Pathophysiologic consequences of hydrocephalus. *Neurosurg Clin N Am*;12:639-49.
- Doetsch F, Alvarez-Buylla A. (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 93:14895Y900.

- Doetsch F, JM García-Verdugo, A Alvarez-Buylla. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neuroscience* 17, 5046-5061.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*; 97:703-16
- Doetsch, F. (2003). A niche for adult neural stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(5), 543–550
- Dziegielewska K.M., Knott W.G., Saunders N.R. (2000). The nature and composition of internal environment of the developing brain. *Cell Mol. Neurobiol.*, 20, 41-56.
- Elkabes S, EM DiCicco-Bloom, IB Black. (1996). Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci* 16, 2508-2521.
- Gato A., Martín P., Alonso M.I., Martín C., Pulgar M.A, Moro J.A. (2004). Analysis of cerebrospinal fluid protein composition in early developmental stages in chick embryos. *J. Exp. Zool.*, 301, 280-289.
- Gato A., Moro J.A., Alonso M.I., Bueno D., de la Mano A., Martin C. (2005). Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *The anatomical record part A.*, 284A, 475-484.
- Gilbert SF. (2000). *Developmental Biology*. 6^o edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.

- Ghashghaei, H. T., Lai, C., & Anton, E. S. (2007). Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nature reviews. Neuroscience*, 8(2), 141–51.
- González, C. A. (2007). "Participación del órgano subcomisural y el líquido cefalorraquídeo en la neurogénesis postnatal". Tesis Doctorado en Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Gritti, A., Bonfanti, L., Doetsch, F., Caille, I., Alvarez-Buylla, A., Lim, D. a, Galli, R., et al. (2002). Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(2), 437–45.
- Jaramillo, C.A. (2009). "Análisis de glicoproteínas secretadas por el OSC hacia el LCR en ratas mutante hidrocefálicas H-Tx y de su efecto sobre el desarrollo de la corteza cerebral". Tesis de pregrado, Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Jiménez, A. J., Tomé, M., Páez, P., Wagner, C., Rodríguez, S., Fernández-Llebrez, P., Rodríguez, E. M., Pérez-Fígares, J. M. (2001). A programmed ependymal denudation occurring during the embryonic life precedes the development of congenital hydrocephalus in the mutant mouse *hyh*. *J Neuropathol Ex Neurol* 60, 1105-1119.
- Jiménez, A. J., García-Verdugo, J. M., González, C. A., Bátiz, L. F., Rodríguez-Pérez, L. M., Páez, P., Soriano-Navarro, M., Roales-Buján, R., Rivera, P., Rodríguez, S., Rodríguez, E. M., Pérez-Fígares, J. M. (2009). Disruption of the neurogenic niche in

- the subventricular zone of postnatal hydrocephalic hyh mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 68:1006-20.
- Johanson C, Jones HC. (2001). Promising vistas in hydrocephalus and cerebrospinal fluid research. *Trends in Neurosciences* 24, 631-632.
- Johanson, C. E., Duncan, J. a, Klinge, P. M., Brinker, T., Stopa, E. G., & Silverberg, G. D. (2008). Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal fluid research*, 5, 10.
- Jones HC, S Dack, C Ellis. (1987). Morphological aspects of the development of hydrocephalus in a mouse mutant (SUMS/NP). *Acta Neuropathol (Berl)* 72, 268-276.
- Jones HC, RM Bucknall. (1988). Inherited prenatal hydrocephalus in the H-Tx rat: a morphological study. *Neuropathology and applied neurobiology* 14, 263-274.
- Jones HC, NG Harris, JR Rocca, RW Andersohn. (2000). Progressive tissue injury in infantile hydrocephalus and prevention/reversal with shunt treatment. *Neurol Res* 22, 89-96.
- Kaiser G, HC Jones. (1991). Cerebrospinal fluid pressure in 10-dy-old rats with congenital hydrocephalus. *Eur J Pediatr Surg Suppl* 1, 20-22.
- Kaneko, N., & Sawamoto, K. (2009). Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions. *Neuroscience research*, 63(3), 155–64.
- Kiefer M, R Eymann, S von Tiling, A Muller, W Steudel, K Booz. 1998. The ependyma in chronic hydrocephalus. *Child´s Nerv Syst*; 14, 263-270.

- Kojima, T., Hirota, Y., Ema, M., Takahashi, S., Miyoshi, I., Okano, H., & Sawamoto, K. (2010). Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *28*(3), 545–54.
- Lichtin, N. (2012). “Estudio del mecanismo de disrupcion de la zoba ventricular y el destino de las celulas troncales neurales denudadas en rata H-Tx hidrocefálica” Tesis de pregrado Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Lim, D. A., A. D. Tramontin, J. M. Trevejo, D. G. Herrera, J. M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez- Buylla. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* *28*: 713-26.
- Lois, C., and A. Alvarez-Buylla. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* *264*: 1145-8.
- Lois, C., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, a. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science (New York, N.Y.)*, *271*(5251), 978–81.
- Luo, J., Shook, B. a, Daniels, S. B., & Conover, J. C. (2008). Subventricular zone-mediated ependyma repair in the adult mammalian brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *28*(14), 3804–13
- Luskin, M. B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* *11*: 173-89.
- Marin, O., and J. L. Rubenstein. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* *26*: 441-83.

- Mashayekhi, F., Draper, C. E., Bannister, C. M., Pourghasem, M., Owen-Lynch, P. J., and Miyan, J. A. (2002). Deficient cortical development in the hydrocephalic Texas (H-Tx) rat: a role for CSF. *Brain* 125: 1859-74.
- Miyan J.A., Mashayekhi F., Bannister C.M. (2001). Developmental abnormalities in early-onset hydrocephalus: clues to signaling. In *Symp. Soc. Exp. Biol.* England, 91-106.
- Miyan JA, M Nabiyouni, M Zendah. (2003). Development of the brain: a vital role for cerebrospinal fluid. *Can J Physiol Pharmacol* 81, 317-328.
- Mirzadeh, Z., Merkle, F. T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell stem cell*, 3(3), 265–78.
- Oi S, C Di Rocco. (2006). Proposal a “evolutionary theory in cerebrospinal fluid dynamics” and minor pathway hydrocephalus in developing immature brain. *Child Nerv Syst* 22, 662-669.
- Ortloff, A. (2008) "Mecanismo celular del denudamiento ependimario en mutantes que desarrollan hidrocefalia congénita". Tesis Doctorado en Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
- Okano, H., & Sawamoto, K. (2008). Neural stem cells: involvement in adult neurogenesis and CNS repair. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 363(1500), 2111–22.

- Owen-Lynch PJ., Draper CE., Mashayekhi F., Bannister CM., Miyan JA. (2003) Defective cell cycle control underlies abnormal cortical development in the hydrocephalic Texas rat. *Brain*, 126, 623-631.
- Páez, P., Batiz, L. F., Roales-Bujan, R., Rodriguez-Perez, L. M., Rodriguez, S., Jimenez, A. J., Rodriguez, E. M., and Perez-Figares, J. M. (2007). Patterned neuropathologic events occurring in hyh congenital hydrocephalic mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 1082-92.
- Pourghasem M, F Mashayekhi, CM Bannister, J Miyan. (2001). Changes in the CSF fluid pathways in the developing rat fetus with early onset hydrocephalus. *Eur J Pediatr Surg* 11, s10-s13.
- Ramirez-Castillejo, C., F. Sanchez-Sanchez, C. Andreu-Agullo, S. R. Ferron, J. D. Aroca-Aguilar, P. Sanchez, H. Mira, J. Escribano, and I. Farinas. (2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* 9: 331-9.
- Rodríguez EM, Blázquez JL, Guerra M. (2010). The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* (31 (4): 757-776.
- Rodríguez, E. M., Guerra, M. M., Vío, K., González, C., Ortloff, A., Bátiz, L. F., Jara, M. C., et al. (2012). A cell junction pathology of neural stem cells leads to abnormal neurogenesis and hydrocephalus *, 231–241.

- Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., Cholfin, J. a, Yamada, M., Spassky, N., Murcia, N. S., et al. (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5761), 629–32.
- Sival D., Guerra M., Den Dunnen W., Bátiz L., Alvial G., Rodríguez E. (2010). Neuroependymal Denudation is in Progress in Full-term in Human Foetal Spina Bifida Aperta. *Brain Pathol.* In Press.
- Sternberger, L.A, Hardy, P. H., Cuculis, J. J, Meyer, H. G. (1970). The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish-peroxidase-anti peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18, 315-333.
- Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J. M., et al. (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell stem cell*, 3(3), 279–88.
- Tramontin, A. D., Garcia-Verdugo, J. M., Lim, D. A., and Alvarez-Buylla, A. (2003). Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex* 13: 580-7.
- Ulfig N, J Bohl, F Neudorfer, P Rezaie. (2004). Brain macrophages and microglia in human hydrocephalus. *Brain and Development.*; 26: 307-315.
- Vaccarino FM, Schwartz ML, Raballo R, Nilsen J, Rhee J, Zhou M,Doetschman T, Coffin JD, Wyland JJ, Hung Y-TE (1999) Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. *Nat Neurosci* 2:246–253.

- Voigt, T. (1989). Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J. Comp. Neurol.* 289, 74–88.
- Wagner, C., Batiz, L. F., Rodriguez, S., Jimenez, A. J., Paez, P., Tome, M., Pérez-Figares, J. M., and Rodriguez, E. M.. (2003). Cellular mechanisms involved in the stenosis and obliteration of the cerebral aqueduct of hyh mutant mice developing congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 1019-40.
- Yamashita, T., Ninomiya, M., Hernández Acosta, P., García-Verdugo, J. M., Sunabori, T., Sakaguchi, M., Adachi, K., et al. (2006). Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(24), 6627–36
- Young, C. C., Brooks, K. J., Buchan, A. M., & Szele, F. G. (2011). Cellular and molecular determinants of stroke-induced changes in subventricular zone cell migration. *Antioxidants & redox signaling*, 14(10), 1877–88.
- Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132(4), 645–60.